



Уральский
федеральный
университет

имени первого Президента
России Б.Н.Ельцина

Физико-
технологический
институт

А. А. БАРАНОВА

РАДИАЦИОННАЯ БИОФИЗИКА

Лабораторный практикум



Министерство образования и науки Российской Федерации
Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б. Н. Ельцина

А. А. Баранова

РАДИАЦИОННАЯ БИОФИЗИКА

Лабораторный практикум

Рекомендовано методическим советом
Уральского федерального университета
для студентов вуза, обучающихся
по направлению подготовки
12.04.04 — Биотехнические системы и технологии

Екатеринбург
Издательство Уральского университета
2018

УДК 577.34 (075.8)

ББК 28.071 я73

Б24

Рецензенты:

директор ФГУП Южно-Уральского института биофизики, канд. биол. наук
С. А. Романов;

научный сотрудник ФГБУ Института промышленной экологии Уро РАН,
канд. биол. наук Г. П. Малиновский

Научный редактор — д-р физ.-мат. наук, проф. А. В. Кружалов

Автор выражает искреннюю благодарность выпускникам-магистрам кафедры экспериментальной физики Е. Н. Агданцевой и А. А. Сперанской за неоценимый вклад в разработку лабораторных работ и внедрение их в учебный процесс

На обложке использовано изображение с сайта https://cdn.radiationtherapynews.com/wp-content/uploads/2015/04/shutterstock_131812463.jpg

Баранова, А. А.

Б24 Радиационная биофизика : лабораторный практикум / А. А. Баранова. — Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2018. — 100 с.

ISBN 978-5-7996-2396-8

Дается описание лабораторных работ. Для каждой работы приводятся краткие теоретические основы рассматриваемой темы или используемого метода, экспериментальные установки; указаны назначение и технические характеристики их составных частей. Подробно описан порядок выполнения работ, формулируется задание на проведение работы, излагаются требования к отчету.

Издание предназначено для студентов вуза, обучающихся по направлению подготовки 12.04.04 — Биотехнические системы и технологии, и специалистов биотехнических специальностей, может быть полезно в научно-исследовательской работе.

Библиогр.: 15 назв. Рис. 14. Табл. 20.

УДК 577.34 (075.8)

ББК 28.071 я73

Учебное издание

Баранова Анна Александровна

РАДИАЦИОННАЯ БИОФИЗИКА

Редактор О. В. Климова. Корректор А. А. Трофимова. Верстка О. П. Игнатьевой

Подписано в печать 15.06.2018. Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Цифровая печать.
Усл. печ. л. 5,8. Уч.-изд. л. 4,6. Тираж 50 экз. Заказ 137

Издательство Уральского университета
Редакционно-издательский отдел ИПЦ УрФУ. 620049, Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, 5
Тел.: +7 (343) 375-48-25, 375-46-85, 374-19-41. E-mail: rio@urfu.ru

Отпечатано в Издательско-полиграфическом центре УрФУ
620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4. Тел.: +7 (343) 358-93-06, 350-58-20, 350-90-13
Факс: +7 (343) 358-93-06. <http://print.urfu.ru>

ISBN 978-5-7996-2396-8

© Уральский федеральный
университет, 2018

Содержание

Введение	4
Лабораторная работа № 1. Изучение методики количественного учета микроорганизмов с помощью счетной камеры Горяева и метода окрашивания.....	6
Лабораторная работа № 2. Построение кривой выживаемости	15
Лабораторная работа № 3. Взаимодействие α -частиц с микроорганизмами.....	27
Лабораторная работа № 4. Взаимодействие γ -излучения с микроорганизмами.....	34
Лабораторная работа № 5. Взаимодействие нейтронного излучения с микроорганизмами.....	46
Лабораторная работа № 6. Исследование комбинированного действия ионизирующего излучения и температуры на микроорганизмы	58
Лабораторная работа № 7. Исследование комбинированного действия ионизирующего и электромагнитного излучения на микроорганизмы	75
Лабораторная работа № 8. Исследование комбинированного действия ионизирующего излучения и ультразвука на микроорганизмы	86
Библиографический список	99

Введение

Актуальность исследований биологического действия ионизирующих излучений продиктована многими научными и социальными задачами.

Во-первых, известно, что все живое постоянно подвергается действию естественного радиационного фона (1–2 мЗв/год), который составляют космическая радиация и излучения радиоактивных элементов, залегающих в поверхностных слоях земной коры и входящих в состав самих живых организмов и их продуктов питания. Во-вторых, в связи с техногенной деятельностью человека, ядерными взрывами и авариями на АЭС и атомных промышленных предприятиях радиационный фон во многих регионах нашей планеты значительно возрос. Если учитывать возможное негативное воздействие ионизирующего излучения, особенно в сочетании с другими загрязнениями среды, то такие условия существенно сказываются в обеспечении нормального функционирования различных организмов и всех элементов окружающей среды. Радиационная биофизика — научная дисциплина, изучающая молекулярные механизмы биологического действия ионизирующих и неионизирующих излучений, выясняющая последовательную картину изменений, начиная от поглощения энергии радиации отдельными молекулами до сложных биологических изменений в клетке и организме. Радиационная биофизика решает радиобиологические проблемы с позиций биофизики, так как радиобиология изучает влияние излучений на биологические объекты и системы,

а биофизика — молекулярные взаимодействия, лежащие в основе нормальных жизненных явлений и патологии. Практикум посвящен изучению действия ионизирующих и неионизирующих излучений на биологические объекты с целью выявления качественных и количественных закономерностей и механизмов биологического действия радиации на эти системы. Подробно описан порядок выполнения работ, формулируется задание на проведение работы, излагаются требования к отчету. Пособие предназначено для студентов дневной формы обучения в рамках курса «Радиационная биофизика».

Лабораторная работа № 1.

Изучение методики количественного учета микроорганизмов с помощью счетной камеры Горяева и метода окрашивания

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: освоить методику количественного учета жизнеспособных дрожжевых клеток с помощью камеры Горяева и метода окрашивания.

О росте микроорганизмов судят по количеству клеток в единице объема. Существует несколько методов определения их числа. Выбор метода зависит от цели исследования, свойств питательной среды или субстрата, а также от особенностей роста и морфологии микроорганизмов.

Наиболее часто число клеток в единице объема определяют методом прямого счета (подсчет под микроскопом), либо косвенно, учитывая рост микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах. В работе изучается метод прямого подсчета клеток, который является наиболее экспрессным, дешевым и доступным.

Подсчитать клетки микроорганизмов под микроскопом можно, используя счетные камеры, капилляры Перфильева, препараты фиксированных и окрашенных клеток, приготовленные на предметных стеклах или мембранных фильтрах. Подсчет клеток производится с помощью счетной камеры Горяева и метода окрашивания [1].

Эта методика рекомендуется для подсчета крупных биологических объектов — дрожжей, одноклеточных водорослей, конидий грибов и некоторых относительно крупных бактерий.

Оборудование и материалы

1. Микроскоп биологический исследовательский универсальный МБИ-15.

Универсальный исследовательский биологический микроскоп МБИ-15 предназначен для визуального наблюдения и фотографирования объектов в проходящем и падающем свете (рис. 1.1).



Рис. 1.1. Микроскоп МБИ-15

2. Счетная камера Горяева.

Счетная камера Горяева — оптическое устройство для подсчета клеток или иных соизмеримых с ними частиц в заданном объеме жидкости. Состоит из толстого предметного стекла, имеющего прямоугольное углубление с нанесенной микроскопической сеткой и тонкого покровного стекла. Часть предметного стекла ниже двух других сторон. Это глубина, для камеры Горяева она равна 0,1 мм (рис. 1.2).

Камера разработана профессором Казанского университета Н. К. Горяевым. Благодаря увеличенному объему сетки она отличается большей точностью подсчета, по сравнению с другими счетными камерами. Размеры малого квадрата камеры Го-

реява $0,05 \times 0,05 \text{ мм}^2$, большого квадрата — $0,2 \times 0,2 \text{ мм}^2$. Сетка камеры Горяева состоит из 225 больших квадратов, из которых 25 разделены на 16 малых квадратов.



Рис. 1.2. Камера Горяева

3. Краситель метиленовый синий.

Для определения жизнеспособности клеток методом окрашивания используют различные красители. В данной работе используется краситель метиленовый синий (0,01 %-й раствор), который под действием ферментов восстанавливается живыми дрожжевыми клетками до бесцветных соединений. Мертвые клетки окрашиваются в синий цвет.

Объекты исследования

Объектами исследования в данной лабораторной работе будут дрожжи, представители царства грибов.

Выбор данных микроорганизмов обусловлен их доступностью, оптимальным размером, высокой скоростью размножения и длительностью жизни.

Дрожжи — группа одноклеточных грибов, утративших мицелиальное строение в связи с переходом к обитанию в жидких и полужидких субстратах [2].

Существует два вида размножения дрожжей: вегетативное и половое, с образованием спор. У большинства видов дрожжей веге-

тативное размножение осуществляется почкованием, редко — делением. Половое размножение происходит при неблагоприятных условиях, когда дрожжи перестают почковаться и превращаются в сумки со спорами. Данная группа объединяет около 1500 видов, относящихся к отделам аскомицетам и базидиомицетам.

К аскомицетам относят дрожжи, половые споры которых формируются эндогенно внутри особых вместилищ — сумок, или асков. Почкование у аскомицетных дрожжей голобластическое: клеточная стенка материнской клетки размягчается, выгибается наружу и дает начало клеточной стенке дочерней. Возможно деление.

Дрожжи-базидиомицеты образуют в ходе полового размножения специальные клетки — базидии, несущие экзогенные споры (базидиоспоры). Почкование базидиомицетных дрожжей энтеробластическое: клеточная стенка материнской клетки разрывается, из разрыва выходит почка и синтезирует свою клеточную стенку с нуля. Деление дрожжевых клеток для базидиомицетов не характерно.

Типичные размеры дрожжевых клеток составляют 3–7 мкм в диаметре. Они могут быть различной формы: эллиптической, овальной, шаровидной и палочковидной (рис. 1.3). Форма и размеры дрожжевых клеток непостоянны и зависят от рода и вида, а также от условий культивирования, состава питательной среды и других факторов.

Представителям дрожжей необходим кислород для дыхания, однако при его отсутствии многие виды способны получать энергию за счет брожения с выделением спиртов.

При пропускании воздуха через сбраживаемый субстрат дрожжи прекращают брожение и начинают дышать, потребляя кислород и выделяя углекислый газ. Это ускоряет рост дрожжевых клеток. Однако даже при доступе кислорода в случае высокого содержания глюкозы в среде дрожжи начинают ее сбраживать.



Рис. 1.3. Формы дрожжевых клеток

Дрожжи достаточно требовательны к условиям питания. В анаэробных условиях дрожжи используют в качестве источника энергии только углеводы. В аэробных условиях круг усваиваемых субстратов шире: помимо углеводов, усваиваются также жиры, углеводороды, ароматические и одноуглеродные соединения, спирты, органические кислоты.

Дрожжевая клетка имеет все основные структуры, которые присущи любой эукариотической клетке, но в то же время она обладает особенностями, свойственными грибам, а именно, сочетанием признаков как растительной, так и животной клеток: клеточная стенка у них ригидная, как у растений, но в клетке отсутствуют хлоропласты и накапливается гликоген, как у животных.

В процессе жизнедеятельности дрожжей различают шесть фаз роста, протекающих с различной скоростью (рис. 1.4).

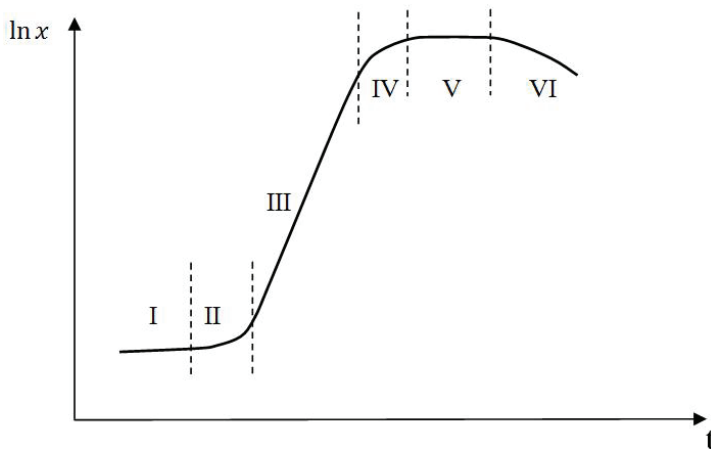


Рис. 1.4. Кривая роста дрожжей.

Фазы: I — латентная; II — ускорения роста; III — экспоненциального роста; IV — замедления роста; V — стационарная; VI — отмирания

Латентная фаза (лаг-фаза) — это период с момента внесения посевного материала в питательную среду до установившейся

постоянной скорости роста культуры. Микроорганизмы приспособляются к новым условиям. Наблюдается заметное увеличение размеров клеток, возрастает содержание в них общего белка, нуклеиновых кислот, энергично синтезируются адаптивные ферменты. Чем полноценнее среда и моложе культура, тем короче лаг-фаза вплоть до того, что данная фаза может отсутствовать совсем. В фазе ускорения, примыкающей к латентной, скорость деления клеток резко ускоряется.

Экспоненциальная или логарифмическая фазы характеризуются максимальной скоростью размножения дрожжей. В этот период численность клеток и их суммарная биомасса возрастают в геометрической прогрессии. Средний размер клеток дрожжей становится минимальным. Для них характерна физиолого-биохимическая активность, и в то же время они более чувствительны к действию различных неблагоприятных факторов, чем зрелые и покоящиеся.

Фаза замедления. В результате действия различных факторов, например, обеднения субстрата питательными веществами или насыщения тормозящими рост продуктами обмена веществ, лаг-фаза ограничена по времени и переходит в фазу замедления с убывающей скоростью размножения.

Стационарной фазе свойственно постоянное число живых организмов и максимальная плотность популяции. В этот период число погибающих клеток становится равным числу вновь образующихся, устанавливается уравновешенное размножение их и отмирание.

Фаза отмирания. Число погибающих клеток превышает число образующихся путем размножения, и общее число клеток сокращается.

На длительность и интенсивность отдельных фаз роста существенно влияют питательная среда, температура и физиологическое состояние дрожжей. Питательная среда должна содержать все необходимые для их роста питательные вещества.

В лабораторной работе в качестве питательной среды используется 4 %-й раствор сахара.

Порядок выполнения работы

1. Приготовьте суспензию дрожжей (минимум за 5 часов до проведения лабораторной работы, чтобы дрожжи находились в стационарной фазе роста). Для ее приготовления разведите 0,16 г сухих дрожжей в 80 мл теплой воды ($\sim 45\text{--}50^\circ\text{C}$), добавьте 3,33 г сахара, тщательно перемешайте и поставьте в теплое место.

2. Перед проведением экспериментов готовую дрожжевую суспензию тщательно перемешайте.

3. В небольшую емкость с помощью микропипетки введите 10 мкл препарата, 140 мкл воды (комнатной температуры) и 20 мкл 0,01 %-го раствора красителя метиленового синего. После каждого забора жидкости необходимо заменять наколечник микропипетки либо промывать его водой.

Очень важно, чтобы при заборе образца взвесь была как можно более однородна. Каждый раз следует три раза набирать взвесь в пипетку и выпускать ее, так как на стенках пипетки остается примерно 5 % от предыдущего образца. Набор взвеси в пипетку три раза гарантирует, что образец не будет разбавлен остатками предыдущего образца или воды, которой промывалась пипетка.

Поскольку метиленовая синь токсична для клеток, ее концентрация должна быть ниже 0,1 %. После того, как дрожжевые клетки окрасятся, они должны быть подсчитаны в течение получаса. При работе с метиленовой синью помните, что так как это очень насыщенная краска, то и пятна от нее очень стойкие.

4. Перемешайте окрашенную взвесь дрожжей, набирая и выпуская ее из пипетки по крайней мере три раза. Наберите 10 мкл суспензии дрожжей и поместите в счетную камеру Горяева.

При работе с камерой необходимо соблюдать определенный порядок ее заполнения. Вначале углубление с сеткой протираем спиртом, а затем покрываем специальным шлифованным покровным стеклом, слегка прижимая и смещая покровное

стекло в противоположные стороны до появления колец Ньютона. Эти кольца указывают на то, что покрывное стекло было притерто к сторонам камеры. Только при таком условии объем взвеси микроорганизмов, находящийся в камере, соответствует расчетному. После этого камера заполняется исследуемой суспензией микроорганизмов. Суспензия вносится через бороздку камеры с помощью микропипетки. Подсчет клеток следует начинать через 3–5 мин после заполнения камеры, чтобы клетки осели и при микроскопировании были видны в одной плоскости.

5. Посчитайте количество живых (неокрашенных) клеток микроорганизмов в 5 больших квадратах сетки, перемещая последние по диагонали. Учитываются все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также клетки, пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата. Количество клеток в 1 мл исследуемой суспензии вычисляется по формуле 1.1:

$$N = \frac{a \cdot 1000 \cdot K}{h \cdot S}, \quad (1.1)$$

где N — число клеток в 1 мл суспензии; a — среднее число клеток в малом квадрате; 1000 — коэффициент пересчета мм^3 в мл ($1 \text{ мл} = 1000 \text{ мм}^3$); K — разведение исходной суспензии; h — глубина камеры (мм); S — площадь малого квадрата (мм^2).

Рассматривая клетки, вам необходимо отметить, как много клеток сгруппировано. Наличие кластеров, или групп клеток, указывает на то, что раствор не был перемешан должным образом, и ваш подсчет не будет репрезентативным для всей дрожжевой смеси. Сфокусируйтесь на клетках и при этом максимально закройте диафрагму. Если фокусировка слишком резкая, вокруг клеток виден ореол. Если фокусировка слишком слабая, то клетки будут выглядеть размытыми. Как только клетки окажутся в фокусе, открывайте диафрагму до тех пор, пока синие клетки все еще будут окрашены в синий цвет, а у неокрашенных клеток видна клеточная мембрана. Если диафрагма откры-

та слишком сильно, клетки будут выглядеть бледными, и при подсчете вы можете потерять часть из них. Фокус очень важен. Слишком резкий фокус может привести к тому, что из-за ореола мертвые клетки будут выглядеть как живые.

6. Полученные данные занесите в табл. 1.1.

7. Повторите пункты 3–5 четыре раза.

8. Для всех экспериментов рассчитайте абсолютную и относительную погрешность.

Таблица 1.1

Результаты экспериментов

№ эксперимента	1	2	3	4	5
Число клеток в большом квадрате камеры Горяева, шт.					
Среднее число клеток, шт.					
Число клеток в 1 мл суспензии, шт.					
Погрешность					

9. После выполнения лабораторной работы необходимо подготовить отчет, который должен содержать:

- основные используемые формулы;
- экспериментальные результаты в виде таблицы;
- необходимые справочные данные, расчет погрешности измерений;
- аргументированные выводы по работе с анализом экспериментальных данных.

Отчет должен быть оформлен в соответствии с общими установленными правилами, сдается один на бригаду, защищается каждым членом бригады.

Лабораторная работа № 2.

Построение кривой выживаемости

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: построить кривую выживаемости популяции дрожжевых клеток при облучении в диапазоне доз 2–12 кГр и экспериментальным путем определить значения показателей летальной дозы излучения LD_{50} и LD_{37} .

Ионизирующим излучением (ИИ) называется поток заряженных или нейтральных частиц, при взаимодействии которых с веществом образуются электрические заряды различных знаков. К ИИ относятся электромагнитные и корпускулярные излучения, энергия которых превышает величину «потенциала ионизации» 10–12 эВ. Характеристиками ИИ являются тип частиц, их энергия, направление распространения, интенсивность, энергетическое, пространственное и временное распределения.

По своему характеру взаимодействия со средой ИИ разделяют на непосредственное и косвенное. Непосредственное ИИ — это излучение, состоящее из заряженных частиц, имеющих кинетическую энергию, достаточную для ионизации при столкновениях (электроны, протоны, α -частицы и т. д.). Косвенное ИИ — это излучение, состоящее из незаряженных частиц, которые могут создавать непосредственное ИИ и (или) вызывать ядерные превращения (нейтроны, γ -кванты).

Обычно различают первичное и вторичное ИИ. Первичное ИИ — это излучение, которое в рассматриваемом процессе взаимодействия со средой принимается за исходное. Вторичное

ИИ возникает в результате взаимодействия первичного ИИ с данной средой.

ИИ обладают очень высоким биологическим эффектом. Они способны вызывать ионизацию любых химических соединений биосубстратов, образовывать активные радикалы в клетках живых тканей. В результате биологического действия радиации, как правило, нарушаются нормальные биохимические процессы с последующими функциональными и морфологическими изменениями в клетках и тканях животных или человека.

В основе первичных радиационно-химических изменений молекул среды лежат два механизма, обозначаемые как прямое и косвенное действие ИИ (рис. 2.1).

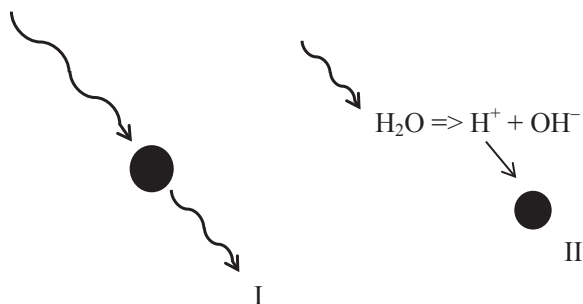


Рис. 2.1. Прямое (I) и косвенное (II) действия ионизирующего излучения на клетку:

черным кружком обозначена мишень, волнистой стрелкой — излучение, пунктирной стрелкой — диффузия свободных радикалов к молекуле-мишени

Под прямым действием понимают такие изменения, которые возникают в результате поглощения энергии излучения самими исследуемыми молекулами («мишенями»). Под косвенным действием понимают физико-химические изменения молекул в растворе, вызванные продуктами радиолитического разложения воды или растворенных веществ, а не энергией излучения, поглощенной самими исследуемыми молекулами.

Таким образом, при косвенном действии ИИ наиболее существенным является процесс радиоллиза полярной молекулы воды, составляющей основную массу вещества клетки (80—85 %). При радиоллизе воды молекула ионизируется, теряя при этом электрон:



Ионизованная молекула воды может реагировать с другой нейтральной молекулой воды, в результате чего образуется радикал гидроксида $\text{OH} \cdot$

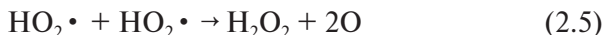


Гидротированный электрон рекомбинирует с молекулами H_2O^+ , создавая сильно возбужденную молекулу H_2O^* , которая распадается с образованием двух радикалов: $\text{OH} \cdot$ и $\text{H} \cdot$



Свободные радикалы содержат неспаренные электроны и поэтому отличаются чрезвычайно высокой реакционной способностью. Время их жизни в воде не более 10^{-5} с. За этот период они либо рекомбинируют друг с другом, либо реагируют с растворенными субстратом.

В присутствии кислорода образуются и другие продукты радиоллиза, обладающие окислительными свойствами — гидропероксиданный радикал $\text{HO}_2 \cdot$, пероксид H_2O_2 и атомарный кислород:



Кроме этих окислительных продуктов, в процессе радиоллиза воды возникает стабилизированная форма электрона — *гидратированные электроны* ($e^- \cdot aq$). Они также обладают высокой реакционной способностью, но уже в качестве восстановите-

ля, а потому реагируют с продуктами радиолиза и другими легко восстанавливающимися веществами, в частности с дисульфидными группами. Другим восстановителем, образующимся в процессе радиолиза воды, является атомарный водород. Процесс радиолиза воды схематически представлен на рис. 2.2.

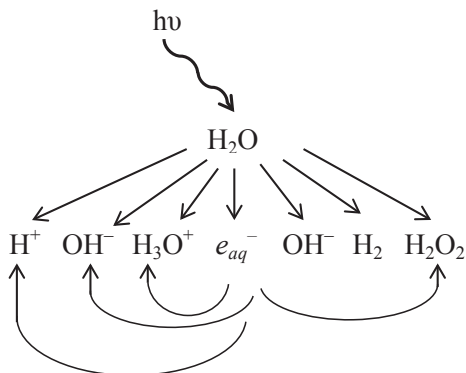


Рис. 2.2. Продукты радиолиза воды

В клетке организма в аналогичной ситуации процесс протекает значительно сложнее, чем при облучении воды, так как поглощающим веществом здесь служат крупные органические молекулы, повреждаемые прямым действием радиации либо продуктами радиолиза воды. Возникающие при этом органические радикалы также обладают неспаренными электронами, а следовательно, крайне реакционноспособны. Располагая большим количеством энергии, они легко могут привести к разрыву химических связей в жизненно важных макромолекулах. Именно этот процесс и происходит чаще всего в промежутке между образованием ионных пар и формированием конечных химических продуктов.

Кроме того, биологический эффект облучения усиливается за счет кислорода, который всегда присутствует в среде и обладает сенсibiliзирующим действием.

Упрощенная схема первичных физико-химических процессов, приводящих в финале к конечному биологическому эффекту, представлена на рис. 2.3.



Рис. 2.3. Схема первичных физико-химических процессов

Следует иметь в виду, что изменения облучаемого субстрата в клетке, возникающие на каждом из этапов, не всегда являются окончательными. Как правило, эти изменения на молекулярном уровне носят промежуточный характер, и конечный результат в каждом конкретном случае не может быть предсказан, так как наряду с повреждением может произойти и репарация (восстановление) исходного состояния.

На уровне клетки и субклеточных структур ИИ вызывают различные реакции — от временной задержки деления клеток до их гибели.

В основе радиационного повреждения клеток лежат нарушения ультраструктуры органелл и связанные с этим изменения обмена веществ. В табл. 2.1 представлены все уровни радиационных повреждений.

Таблица 2.1

Радиационные повреждения на всех уровнях

Время	Эффект воздействия
10^{-24} – 10^{-4} с 10^{-16} – 10^{-8} с	Поглощение энергии (рентгеновское, γ -нейтронное излучения) Поглощение энергии (электроны, протоны, α -, β -частицы)
10^{-12} – 10^{-8} с	Физико-химическая стадия. Перенос энергии в виде ионизации на первичной траектории. Ионизированные и электронно-возбужденные молекулы.
10^{-7} – 10^{-5} с, несколько часов	Химические повреждения. Прямое действие. Косвенное действие. Свободные радикалы, образующиеся из воды. Возбуждение молекулы до теплового равновесия.
Микросекунды, секунды, минуты, несколько часов	Биомолекулярные повреждения. Изменения молекул белков, нуклеиновых кислот под влиянием нарушения процессов обмена.
Минуты, часы, недели	Ранние биологические и физиологические эффекты. Биохимические повреждения. Гибель клеток и отдельных животных.
Годы, столетия	Отдаленные биологические эффекты. Стойкое нарушение функций. Сенетические мутации, действующие на потомство. Соматические эффекты (рак, лейкоз, сокращение продолжительности жизни, гибель организма).

Повреждения цитоплазматических структур проявляются в нарушении энергетического обеспечения клеток и проницаемости клеточной мембраны, нарушении обмена веществ, целостности лизосом, что ведет к гибели клеток.

Изменения в ядре клетки тормозят синтез ДНК. Возникают однонитевые и двунитевые разрывы, приводящие к хромосомным нарушениям. Появляются генные мутации. При однонитевых разрывах и других незначительных повреждениях могут идти репаративные процессы. Повреждения ядра приводят к синтезу измененных белков, которые впоследствии способствуют образованию злокачественных опухолей, вторичных радиотоксинов, вызывающих лучевую болезнь и преждевременное старение. Наиболее чреваты последствиями повреждения генома клетки и хромосомного аппарата, ведущие к нарушению механизма митоза.

Малые дозы ИИ вызывают обратимые изменения клетки. Они проявляются сразу или через несколько минут после облучения и с течением времени исчезают. К ним относятся: ингибирование нуклеинового обмена, изменения проницаемости клеточных мембран, задержка митозов, изменения хроматина ядер и др.

При «больших» дозах облучения в клетках наступают летальные изменения, приводящие к их гибели до вступления в митоз (интерфазная гибель), либо в момент митотического деления (митотическая репродуктивная гибель).

Основной причиной репродуктивной гибели клеток являются структурные повреждения ДНК, возникшие под влиянием облучения. Погибают все делящиеся клетки. Гибель клеток ведет к опустошению тканей, нарушению их структуры и функции.

Полное подавление митозов наступает после воздействия больших доз ИИ, когда клетка значительное время продолжает жить, но необратимо утрачивает способность к делению. В результате такой необратимой реакции на облучение часто образуются патологические формы гигантских клеток, содержащие несколько наборов хромосом вследствие их репликации в пределах одной и той же неразделившейся клетки.

Зависимость биологического эффекта от дозы излучения. Кривая «доза — эффект»

Строгие количественные эксперименты впервые были проведены в конце 20-х годов XX века. Для количественных экспериментов радиобиологи стали использовать клоны генетически однородных клеток, вирусные частицы, препараты макромолекул, т. е. такие системы, в которых легко определить реакцию единичного объекта на действие излучения в данной дозе.

Уже в первых радиобиологических исследованиях отмечалась важнейшая закономерность — вероятностная природа проявления реакции клеток на облучение. При оценке зависимости доли погибших клеток от величины дозы облучения выяснялось, что различные одноклеточные объекты гибнут при самых малых дозах облучения, с ростом дозы увеличивается число погибших клеток, однако даже при облучении в очень высоких дозах некоторое число клеток сохраняет жизнеспособность.

Существенно, что с ростом дозы облучения наблюдалось увеличение не столько степени проявления эффекта (глубины поражения отдельной клетки), сколько доли летально пораженных клеток в облученной популяции.

Примеры типичных графических кривых, отражающих зависимость доли выживших клеток от величины дозы облучения (кривые «доза — эффект»), приведены на рис. 2.4.

На графике, на оси абсцисс откладывают величину дозы, а на оси ординат — меру радиобиологического эффекта: выживаемость клеток, выход хромосомных aberrаций, интенсивность дыхания и т. п.

Для построения этих кривых определенное количество объектов данного вида облучали в широком диапазоне доз; после облучения в каждой дозе определяли долю объектов, сохранивших исходные свойства, по отношению к их общему числу до облучения. Основными параметрами, которые определяют при построении кривой, являются максимальный возмож-

ный эффект (E_{\max}) и доза, что вызывает полумаксимальный эффект (LD_{50}).

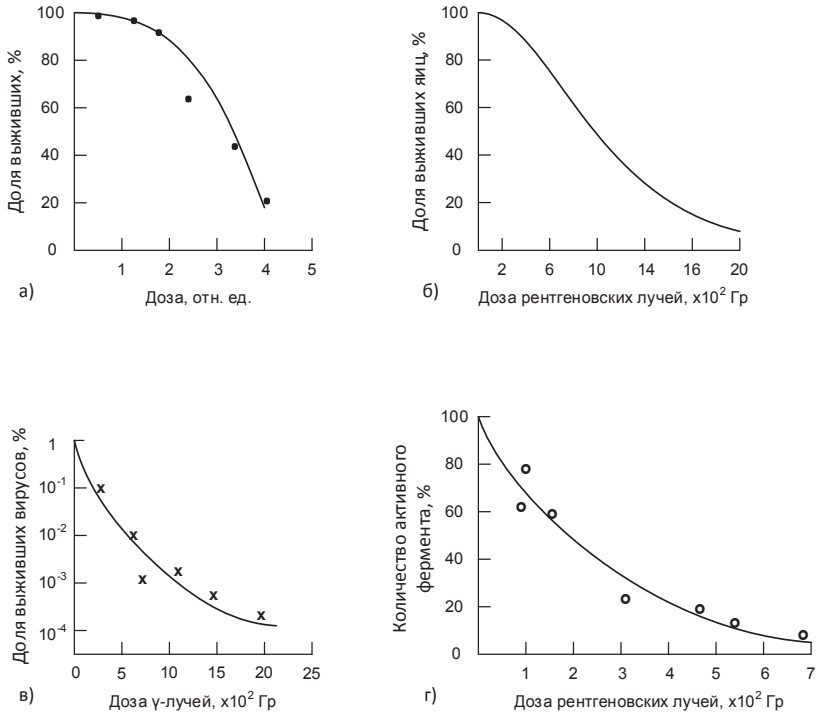


Рис. 2.4. Зависимость конечных биологических эффектов от дозы облучения:

а) гибель инфузорий *Colpidium colpoda* через 2 часа после облучения; б) гибель яиц аскариды после облучения в аэробных условиях; в) инактивация вируса табачной мозаики γ -лучами; г) инактивация сухой рибонуклеазы

В 2008 году в УрФУ на кафедре экспериментальной физики запущен и успешно работает инновационно-внедренческий центр радиационной стерилизации. Линейный ускоритель электронов модели УЭЛР-10-10С2 «КОРАД» (рис. 2.5) предназначен для использования в качестве источника элек-

тронов для радиационной стерилизации медицинских изделий, облучения продуктов питания, облучения заготовок термоустойчиваемых изделий и других радиационно-технологических процессов. Параметры пучка ускоренных электронов линейного ускорителя УЭЛР-10-10С2 представлены в табл. 2.2.



Рис. 2.5. Установка Центра радиационной стерилизации УрФУ на базе кафедры ЭФ ФТИ

Таблица 2.2

**Параметры пучка ускоренных электронов линейного ускорителя
УЭЛР-10-10С2**

Параметр	Значение
Максимальная энергия ускоренных электронов, МэВ	10
Максимальный средний ток выведенного в атмосферу пучка электронов, мА	1
Диапазон регулирования энергии электронов, МэВ	8–10
Частота следования импульсов электронного тока, 1/с	50–240
Максимальный размер поля облучения на расстоянии 100 мм от выпускной фольги, мм	600×20
Равномерность поля облучения по длине развертки на поверхности облучаемых коробок, %	±5
Частота сканирования электронного пучка, Гц	1–3

На ускорителе можно облучать образцы дозами в пределах от 2 до 12 кГр. Для того чтобы получить желаемые дозы, на образцы необходимо выкладывать защиту из алюминия.

Оборудование и материалы

1. Микроскоп МБИ-15.
2. Камера Горяева.
3. Метиленовая синь.
4. Линейный ускоритель электронов модели УЭЛР-10-10С2.
5. Сухие дрожжи.

Порядок выполнения работы

Перед выполнением лабораторной работы внимательно ознакомьтесь с культивированием клеток и их количественным учетом в лабораторной работе № 1. Провести начальный количественный учет клеток, как описано в лабораторной работе № 1.

Облучение образцов

1. После предварительного учета количества клеток образцы разлейте в четыре пробирки типа эпиндорф. Одну пробирку оставьте в качестве контрольного образца.

2. Поместите пробирки (кроме контрольного образца) под пучок линейного ускорителя электронов и облучите дозами, равными 2, 4, 8 кГр.

3. После облучения проведите количественный учет всех образцов. Результаты занести в табл. 2.3.

4. По данным табл. 2.3 постройте кривую выживаемости дрожжей от дозы. По кривой «доза — эффект» определите показатели LD_{50} и LD_{37} .

Таблица 2.3

Результаты измерения для разных доз

Доза, кГр	Число клеток в 1-м квадра- те, шт.	Число клеток в 2-м квадра- те, шт.	Число клеток в 3-м квадра- те, шт.	Число клеток в 4-м квадра- те, шт.	Число клеток в 5-м квадра- те, шт.	Среднее число клеток, шт.	Число клеток в 1 мл суспен- зии, клеток/мл	Выживаемость, доли
0								
2								
4								
8								

5. Отчет должен содержать

- цель работы;
- краткие теоретические сведения, характеризующие взаимодействие ионизирующего излучения с веществом;
- экспериментальные результаты в виде таблиц и графиков;
- аргументированные выводы по работе с анализом экспериментальных данных.

Отчет должен быть оформлен в соответствии с общими установленными правилами, сдается один на бригаду, защищается каждым членом бригады.

Лабораторная работа № 3.

Взаимодействие α -частиц с микроорганизмами

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: исследовать влияние α -излучения на популяцию дрожжевых клеток.

Испускание α -частиц является единственным типом радиоактивности, за исключением спонтанного деления, в котором из ядра самопроизвольно испускаются тяжелые частицы.

Последние элементы периодической таблицы Менделеева обладают α -радиоактивностью, согласно эмпирическому закону Гейгера — Нетолла, при небольшом различии энергии в пределах 4,0–9,0 МэВ имеют колоссальный разброс изменения по времени жизни от 10^{-7} с до 10^{10} лет. Спектр α -частиц состоит из нескольких моноэнергетических линий, соответствующих квантовым переходам на различные энергетические уровни дочернего ядра.

При α -распаде реализуется правило сдвига, сформулированное Фаянсом и Содди: элемент, образовавшийся из другого элемента при испускании α -лучей, занимает в периодической системе место на две группы левее исходного элемента.

Главными характеристиками α -радиоактивных ядер и испускаемых ими α -частиц являются период полураспада, кинетическая энергия и пробег.

Вследствие положительного заряда и относительно невысокой скорости α -частицы интенсивно взаимодействуют с электронами поглощающего материала, быстро расходуя свою энергию. При этом они успевают пройти очень небольшое расстояние и обладают самой высокой степенью иониза-

ции различных сред и веществ. Так, в воздухе на своем коротком пути движения одна α -частица приводит к образованию от 116 до 254 тыс. пар ионов. В воздухе α -частицы имеют путь пробега от 2,5 до 11 см, а в мягких тканях живых организмов — всего лишь 30–130 микрон в зависимости от своей энергии.

Возбуждение атомов требует меньше энергии, чем ионизация, и летящая заряженная частица способна возбуждать атомы, расположенные на большем расстоянии от ее траектории, чем при ионизации. На каждый акт ионизации приходится 2–3 акта возбуждения.

Из-за большого различия между массами тяжелой α -частицы и массой электрона частица теряет энергию малыми порциями, в процессе многочисленных столкновений с электронами среды не отклоняется от первоначального направления движения, создавая ярко выраженный трек. Минимальная толщина поглотителя, необходимая для полного поглощения энергии заряженной частицы, называется линейным пробегом R .

Пробег заряженной частицы заданной энергии в различных веществах обратно пропорционален концентрации электронов в поглощающей среде:

$$R \sim \frac{1}{NZ}, \quad (3.1)$$

где N — число атомов в единице объема вещества.

Но известно, что

$$N = \frac{Z_0 \rho}{A}. \quad (3.2)$$

Тогда

$$R \sim \frac{A}{Z_0 \rho Z} \quad (3.3)$$

или

$$R_p \sim \frac{A}{Z_0 Z}. \quad (3.4)$$

Таким образом, если пробег выражать в массе вещества, проходящего на единицу площади (в г/см²), то он будет зависеть только от соотношения Z/A — мало меняющейся величины для элементов начала и середины периодической системы ($Z/A \approx 0,5$), поэтому средний массовый пробег заряженных частиц практически одинаков во всех веществах и несколько возрастает в таких тяжелых веществах, как свинец или уран.

Обычно пробег определяют по эмпирическим или полуэмпирическим формулам:

- формула Гейгера для воздуха:

$$R_{\alpha} = 0,32 \cdot E_{\alpha}^{3/2}, \quad (3.5)$$

- для любого вещества:

$$R_{\alpha} = 10^{-4} \cdot \frac{N_A \cdot E_{\alpha}^3}{\rho}. \quad (3.6)$$

Таким образом, проникающая способность и пробег α -частиц малы:

- α -частицы (5 МэВ): в воздухе $R_{\alpha} = 4$ см, в биологической ткани $R_{\alpha} = 30$ мкм;
- осколки (5 МэВ): в воздухе $R = 2$ см, в биологической ткани $R = 10$ мкм;
- α -частицы (8 МэВ): в биологической ткани $R_{\alpha} = 77$ мкм (проникает через эпидермис кожи).

Внешнее α -излучение опасно для здоровья только в случае высокоэнергичных α -частиц (с энергией выше десятков 10 МэВ). Однако проникновение α -частиц внутрь организма, когда облучению подвергаются живые ткани организма, весьма опасно для здоровья, поскольку высокая плотность ионизации вдоль трека частицы сильно повреждает биомолекулы. Считается, что при равном энерговыделении (поглощенной дозе) эквивалентная доза создается внутренним облучением радионуклидным диапазоном α -частицами

с энергией в 20 раз выше, чем при облучении гамма и рентгеновскими квантами.

Попадание этих достаточно массивных частиц внутрь организма (с пищей, водой или через поврежденную кожу) чревато серьезным поражением внутренних органов или тканей из-за их сильного ионизирующего действия, образования окислителей, свободного водорода и кислорода. Накопление в гипофизе свободных радикалов, коре надпочечников и других тканях приводит к патологии в работе различных систем и органов, к снижению адаптационных свойств организма.

Из всех видов ионизирующих излучений поток α -частиц считается менее опасным с точки зрения внешнего облучения, поскольку при внешнем облучении он не требует специальных средств защиты. Расстояние от источника излучения в 10–20 см, экран из обычной бумаги, ткани или тонкого слоя алюминия, одежда — поглощают данный тип излучения.

Опасность представляет внутреннее облучение, следует не допускать проникновения α -излучающих радионуклидов внутрь организма, а также использовать средства индивидуальной защиты:

- комбинезоны, шлемы, нарукавники и обувь из специальных материалов;
- очки или щитки из оргстекла для защиты хрусталика глаз;
- дерматологические пасты и кремы следует использовать для защиты чувствительной кожи;
- не допускать к работе лиц с повреждениями кожи (раны, царапины).

Выбор метода регистрации определяется задачей эксперимента. Основным интерес представляют: 1) число частиц, испускаемых в телесный угол за единицу времени, 2) момент испускания частиц, 3) энергия частиц.

Для детектирования α -частиц используют сцинтилляционные, газоразрядные детекторы, кремниевые pin-диоды (поверхностно-барьерные детекторы, нечувствительные к β -

и γ -излучению), а также наиболее популярны трековые детекторы.

В настоящее время наиболее распространены кремниевые поверхностно-барьерные детекторы α -частиц, в которых на поверхности полупроводникового кристалла с проводимостью p -типа создается тонкий слой с проводимостью n -типа путем диффузионного введения донорной примеси (например, фосфора).

Полученные знания о физико-химических свойствах α -излучения позволили разработать тактику α -терапии в медицине. Используются изотопы — радона, торона, имеющие малые сроки жизни и быстро выводимые из организма. Возможно также введение лекарственного препарата непосредственно внутрь органа и образование там α -частиц при облучении нейтронами.

Спектр возможных процедур включает:

- радоновые ванны;
- питье радоновой воды;
- радоновые аппликации и орошения;
- вдыхание воздуха с радоновым компонентом.

α -терапия оказывает противовоспалительное, обезболивающее и успокаивающее действие, поэтому показана для лечения гинекологических, сердечно-сосудистых заболеваний, а также проблем с опорно-двигательным аппаратом, обладает обезболивающим и противовоспалительным действием. Однако α -терапия противопоказана при злокачественных опухолях, туберкулезе, некоторых заболеваниях крови, при беременности.

Оборудование и материалы

1. Микроскоп МБИ-15.
2. Камера Горяева.
3. Метиленовая синь.
4. α -источники ^{239}Pu с активностями $2,43 \times 10^3$; 540; 246; 44; 3,29 Бк.
5. Сухие дрожжи.

В качестве источников α -излучения используются радионуклиды ^{239}Pu , параметры источников приведены в табл. 3.1.

Таблица 3.1

Параметры источников

№ источника	Активность, Бк	Поток, имп/с	Плотность потока, имп/(с·см ²)
236	2430	541	4,77
233	540	122	1,08
231	246	55	0,49
228	44	9,58	0,08
222	3,29	1,12	0,01

Порядок выполнения работы

Перед выполнением лабораторной работы внимательно ознакомьтесь с культивированием клеток и их количественным учетом в лабораторной работе № 1. Проведите начальный количественный учет клеток, как описано в лабораторной работе № 1.

1. Распределите суспензию в чашки Петри*, по 500 мкл в каждую. Источники с разным потоком расположите на расстоянии 1,5 см над поверхностью. Одну группу оставьте без воздействия ИИ (контрольная группа).

2. Через 1,5 часа источники уберите.

3. Проведите подсчет клеток во всех группах.

4. Через 1 час проведите повторный количественный учет.

5. Сравните результаты облученных групп с контрольной группой.

6. Результаты занесите в табл. 3.2.

* Количество чашек определяется преподавателем при выполнении лабораторной работы.

Таблица 3.2

Результат взаимодействия α -излучения с микроорганизмами

№ источника	Контроль	236	233	231	228	222
Число клеток в большом квадрате камеры Горяева, шт.						
Число клеток в 1 мл суспензии, шт.						
Погрешность						
Выживаемость						

8. Постройте графики зависимости среднего числа клеток от потока для 1,5 и 2,5 часов.

9. Отчет должен содержать:

- название работы;
- цели работы;
- краткие теоретические сведения, характеризующие взаимодействие ионизирующего излучения с веществом;
- экспериментальные результаты в виде таблиц и графиков;
- аргументированные выводы по работе с анализом экспериментальных данных.

Отчет должен быть оформлен в соответствии с общими установленными правилами, сдается один на бригаду, защищается каждым членом бригады.

Лабораторная работа № 4.

Взаимодействие γ -излучения с микроорганизмами

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: исследование влияния γ -излучения на популяцию дрожжевых клеток.

Фотонное излучение — жесткое электромагнитное излучение, является сильно проникающим и представляет опасность как при внешнем, так и при внутреннем облучении. γ -излучающими является абсолютное большинство радионуклидов. Из наиболее часто применяемых в промышленности следует отметить кобальт-60, церий-144, цезий-134, -137, иридий-192, селен-75, сурьму-124, европий-152, -154, тулий-170, радий-226.

Облучение γ -квантами в зависимости от дозы и продолжительности может вызвать хроническую и острую лучевые болезни. Стохастические эффекты облучения включают различные виды онкологических заболеваний. В то же время γ -облучение подавляет рост раковых и других быстро делящихся клеток.

Стохастические эффекты — вредные биологические эффекты, вызванные ионизирующим излучением, не имеющие дозового порога возникновения, вероятность возникновения которых пропорциональна дозе и для которых тяжесть проявления не зависит от дозы.

Хорошо выявлены два основных вида стохастических эффектов. Первый возникает в соматических клетках и может в результате вызвать появление рака у облученного лица; второй возникает в клетках зародышевой ткани половых желез и может привести к наследуемым нарушениям у потомства облученных.

К стохастическим эффектам относят радиационно-индуцированные онкологические заболевания, лейкозы, относительное сокращение продолжительности жизни.

При больших дозах степень гибели клеток может оказаться значительной и достаточной для того, чтобы привести к заметным изменениям ткани. Гибель клеток в результате повреждения жизненно важных структур клетки часто проявляется через несколько часов или дней после облучения популяций быстро делящихся клеток. В популяциях медленно делящихся клеток гибель может не обнаруживаться в течение месяцев или даже лет. Доля погибших клеток в популяции возрастает с дозой. Если погибнет достаточно большое число клеток ткани или органа, то функция ткани или органа нарушается. В крайних случаях может погибнуть сам организм. Это и есть те эффекты, которые определяются как детерминированные (в 1977 году называвшиеся МКРЗ нестохастическими).

Детерминированные эффекты — клинически выявленные вредные биологические эффекты, вызванные ионизирующим излучением, в отношении которых предполагается существование порога, ниже которого эффект отсутствует, а выше — тяжесть эффекта зависит от дозы.

Детерминированные эффекты у человека могут быть результатом общего или локального облучения ткани, вызывающего гибель некоторой части клеток, которая не может быть компенсирована размножением жизнеспособных клеток. Произошедшая потеря клеток может вызвать тяжелое и обнаруживаемое клинически нарушение функции ткани или органа. Следовательно, можно ожидать, что степень тяжести наблюдаемого эффекта зависит от дозы. Должен существовать порог, ниже которого потеря клеток слишком мала, чтобы заметно нарушить функцию ткани или органа.

Генетические эффекты проявляются вследствие мутаций — изменений наследственных свойств организма, возникающих естественно или вызываемых искусственно, например при об-

лучении. Мутации возникают в результате перестройки и нарушений в генетическом материале организма (хромосомах и генах).

Виды генетических последствий:

- 1) хромосомные aberrации — поломка хромосомы в результате прямого попадания ионизирующего излучения;
- 2) доминантные мутации — облученные хромосомы проявляют себя преимущественно в первом поколении;
- 3) рецессивные мутации — облученные хромосомы проявляют себя через несколько поколений.

На данный момент нет эпидемиологических данных, подтверждающих наличие генетических эффектов у человека, но с другой стороны, нет эпидемиологических данных, опровергающих данную гипотезу.

Таблица 4.1

Примерная классификация лучевых поражений организма человека

Тканевая поглощенная доза D , Гр	Краткая характеристика лучевых поражений
До 0,25	Никаких заметных изменений в организме человека не наблюдается
0,25...0,5	Незначительные изменения в составе крови
0,5...1	Отклонения в составе крови. При 1 Гр наблюдается временная стерилизация
Выше 1	Развивается острая лучевая болезнь различной степени тяжести
1...2	Легкая форма лучевой болезни. Резкое изменение состава крови. Тошнота, рвота
2,5...4	Лучевая болезнь средней степени тяжести. Резкое уменьшение количества лейкоцитов, рвота, подкожные кровоизлияния. Через 2...6 недель возможна гибель (20 %)
4...6	Тяжелая форма лучевой болезни. Организм полностью теряет сопротивляемость. Гибель (50 %)
Более 6	Крайне тяжелая форма заболевания. Без лечения гибель (100 %). Инфекционные заболевания и кровоизлияния

Каждому биологическому виду свойственна своя мера чувствительности к действию ионизирующей радиации, которая характеризует его радиочувствительность. Степень радиочувствительности сильно варьируется в пределах одного вида (индивидуальная радиочувствительность), а для определенного индивидуума зависит также от возраста и пола, даже в одном организме различные клетки и ткани очень сильно различаются по радиочувствительности.

Как эффективный терапевтический метод лечения γ -излучение применяется в медицине. Эта методика носит название лучевой терапии, более половины онкологических больных в определенные периоды времени лечения получают сеансы лучевой терапии.

Высокоэнергетичные фотоны используют при облучении глубоко расположенных опухолей, локализованных на глубине более 8–10 см от поверхности. Такие источники, как радий-226, иридий-192, иод-125, цезий-137, кобальт-60 используются при брахитерапии.

Брахитерапия (контактная лучевая терапия) — вид радиотерапии, когда источник излучения вводится внутрь пораженного органа. Излучение от источника, имплантированного в орган, характеризуется оптимальными геометрическими характеристиками при минимизации воздействия на здоровые ткани. Широко используется в лечении опухолей шейки матки, тела матки, предстательной железы (простаты), влагалища, пищевода, прямой кишки, языка и др.

При прохождении фотонного излучения через вещество наблюдаются различные виды взаимодействия фотонов с атомами среды. Следствием этого является уменьшение интенсивности (потока, плотности потока) первичного γ -излучения и появление вторичного излучения: рассеянных фотонов и электронов.

Ослабление интенсивности излучения фотонов в области средних энергий (до 10 МэВ) происходит в основном в результате трех процессов: фотоэффекта, Комптон-эффекта (компто-

новского рассеяния) и эффекта образования электрон-позитронных пар. Вероятность взаимодействия по каждому эффекту характеризуется своим коэффициентом, зависящим от энергии фотонов и эффективного атомного номера материала. В общем случае все три процесса могут протекать одновременно, поэтому полный линейный коэффициент ослабления моноэнергетического фотонного излучения μ (см^{-1}) равен сумме трех коэффициентов:

$$\mu = \tau + \sigma + \chi, \quad (4.1)$$

где τ , σ , χ — линейные коэффициенты ослабления, соответственно, характеризующие вероятность фотоэффекта, Комптон-эффекта и эффекта образования пар.

При фотоэлектрическом поглощении (фотоэффекте) фотон поглощается атомом и освобождается фотоэлектрон. Преимущественно фотоэффект идет на K -оболочке.

Баланс энергии при фотоэлектрическом поглощении имеет вид:

$$E_\gamma = E_i + E_e, \quad (4.2)$$

где E_e — кинетическая энергия фотоэлектрона.

Вылетевший из атома электрон освобождает место на соответствующем энергетическом уровне, которое может быть занято менее связанным электроном с расположенных выше L -, M -, N -оболочек. Подобный переход сопровождается выделением кванта характеристического рентгеновского излучения, спектр которого определяется энергетическим положением электронных уровней конкретного материала-поглотителя.

Коэффициент фотоэлектрического поглощения можно записать в виде суммы двух коэффициентов:

$$\tau = \tau_k + \tau_s, \quad (4.3)$$

где τ_k — часть коэффициента, характеризующая преобразование энергии первичных фотонов в кинетическую энергию электронов; τ_s — часть коэффициента, характеризующая преобразова-

ние энергии первичных фотонов в энергию характеристического рентгеновского излучения.

Величина коэффициента τ_s относительно мала, поэтому на практике его не учитывают. Зависимость τ от энергии E_γ и порядкового атомного номера z имеет следующий вид:

$$\tau = \frac{c \cdot z^4}{E_\gamma^3}, \quad (4.4)$$

где c — коэффициент, постоянный между скачками поглощения (резонансным поглощением) и постоянный для всех энергий выше энергии, соответствующей K -краю поглощения.

Анализируя формулу (4.5), можно сказать, что фотоэффект с наибольшей вероятностью идет при малых энергиях фотонов и для материалов с большим порядковым атомным номером z .

При увеличении энергии фотонов при постоянном z сечение фотоэффекта уменьшается и начинает преобладать эффект комптоновского рассеяния (эффект Комптона). Это процесс неупругого рассеяния фотона на свободном электроны, при котором в каждом акте взаимодействия первичный γ -квант передает «свободному» электрону атома часть своей энергии, испытывая упругое рассеяние. Вторичный (рассеянный) γ -квант E_{γ_s} имеет меньшую энергию, чем первичный E_γ , и изменяет направление распространения, а электрон получает некоторую кинетическую энергию $E_{ке}$. Баланс энергии при комптоновском рассеянии имеет вид:

$$E_{ке} = E_\gamma - E_{\gamma_s}. \quad (4.5)$$

Сечение (то есть вероятность) комптоновского рассеяния состоит из двух составляющих, характеризующих распределение энергии между комптоновским электроном и рассеянным фотоном:

$$\sigma = \sigma_k + \sigma_s. \quad (4.6)$$

Зависимость σ от энергии и порядкового номера имеет вид:

$$\sigma \cong z \cdot f(E\gamma). \quad (4.7)$$

Эффект комптоновского рассеяния прямо пропорционален z и плавно падает с ростом энергии γ -излучения.

Угол между падающим и рассеянным γ -излучением определяется из условия

$$E_{\gamma s} = \frac{E_{\gamma}}{1 + \frac{E_{\gamma}}{m_0 \cdot c^2} \cdot (1 - \cos \theta)}, \quad (4.8)$$

где $m_0 c^2 = 0,511$ МэВ — энергия массы покоя электрона; θ — угол рассеяния первичного γ -кванта.

Из формулы следует, что при рассеянии кванта назад ($\theta = 180^\circ$) рассеянные кванты не могут иметь энергии более 0,25 МэВ.

На практике вторичное фотонное излучение, появляющееся при Комптон-эффекте, необходимо учитывать, например, при проектировании защиты от фотонного излучения, при радиометрических и дозиметрических измерениях, при определении доз, толщины защитных барьеров и их конфигураций.

Эффект образования пар — эффект рождения электрона и позитрона в поле ядра. Этот эффект пороговый, он протекает при $E\gamma > 2m_0 c^2$. В Кулоновском поле ядра первичный фотон превращается в пару частиц, сообщая им кинетическую энергию:

$$E\gamma = E_{e^-} + E_{e^+} + 1,022 \text{ МэВ}, \quad (4.9)$$

где E_{e^-} , E_{e^+} — кинетические энергии электрона и позитрона соответственно; $1,022 \text{ МэВ} = 2m_0 c^2$ — энергия массы покоя электрона и позитрона.

Движущийся в веществе позитрон, замедлившись, взаимодействует с одним из электронов, аннигилирует, и в результа-

те возникает вторичное фотонное излучение в виде двух аннигиляционных γ -квантов по 0,5 МэВ. Таким образом, энергия первичных фотонов преобразуется в кинетическую энергию ионизирующих частиц и в энергию аннигиляционного фотонного излучения. Поэтому сечение эффекта образования пар, как и для фотоэффекта и Комптон-эффекта, можно представить в виде суммы

$$\chi = \chi_k + \chi_s. \quad (4.10)$$

Зависимость сечения χ от энергии и порядкового номера имеет вид:

$$\chi \cong z^2 \cdot (E_\gamma - 2m_0 \cdot c^2). \quad (4.11)$$

Из (4.12) видно, что данный эффект идет с большей вероятностью для материалов с большим порядковым номером и при энергиях фотонов больше 1,022 МэВ. Его вклад в величину линейного коэффициента ослабления μ при энергии фотонов, испускаемых естественными и искусственными радионуклидами, мал и является определяющим для фотонов с большой энергией, генерируемых на ядерно-физических установках.

С учетом коэффициентов τ , σ , χ , представленных в виде сумм (4.4; 4.7 и 4.11), полный линейный коэффициент ослабления μ можно записать как

$$\mu = \mu_k + \mu_s, \quad (4.12)$$

где μ_k — часть коэффициента, характеризующая долю энергии первичных фотонов, преобразованную в кинетическую энергию заряженных частиц в результате всех процессов взаимодействия; μ_s — часть коэффициента, характеризующая преобразование энергии первичных фотонов в результате всех процессов взаимодействия в энергию вторичного фотонного излучения (характеристическое, комптоновское, аннигиляционное, а также тормозное, возникающее при торможении заряженных частиц в поле ядра).

Для дозиметрии особенно существенна та часть энергии фотонов, которая преобразуется в кинетическую энергию вторичных заряженных частиц (электронов и позитронов), т. к. именно заряженные частицы создают радиационный эффект. Для примера на рис. 4.1 представлены энергетические зависимости парциальных сечений τ , σ , χ и полного линейного коэффициента ослабления.

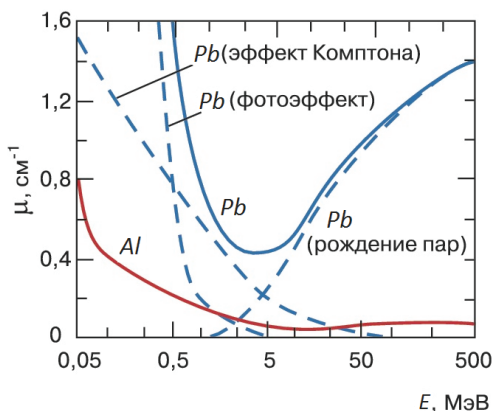


Рис. 4.1. Зависимости парциальных сечений τ , σ , χ и полного линейного коэффициента ослабления фотонов от их энергии для свинца

Наряду с линейным коэффициентом ослабления μ различают массовый μ_m , атомный μ_a и электронный μ_e коэффициенты ослабления.

Связь между ними определяется соотношениями:

$$\mu = \mu_m \rho = \mu_a \frac{N_a}{A} \rho = \mu_e \frac{N_a}{A} Z \rho, \quad (4.13)$$

где N_a — число Авогадро; A — атомная масса; Z — атомный номер; ρ — плотность среды.

Оборудование и материалы

1. Микроскоп МБИ-15.
2. Камера Горяева.
3. Метиленовая синь.
4. γ -источники ^{241}Am , ^{137}Cs , ^{60}Co .
5. Сухие дрожжи.

В качестве источников ионизирующего излучения необходимо использовать 3 точечных γ -источников, характеристики которых приведены в табл. 4.1. Активности источников указаны на рабочем месте.

Таблица 4.2

Характеристики используемых источников γ -излучения

Радионуклид	E_γ , МэВ	Керма-постоянная Γ_k , аГр·м ² /(с·Бк)	γ -постоянная Γ_n , см ² Р/(ч·мКи)	Период полураспада
^{241}Am	0,060	0,77	0,85	432 года
^{137}Cs	0,661	21,4	23,7	30,17 лет
^{60}Co	1,25	84,6	94,0	5,27 лет

Порядок выполнения работы

Перед выполнением лабораторной работы внимательно ознакомьтесь с культивированием клеток и их количественным учетом в лабораторной работе № 1. Проведите начальный количественный учет клеток, как описано в лабораторной работе № 1.

1. Перед облучением дрожжей рассчитайте мощности воздушной кермы и эквивалентной дозы, создаваемые каждым источником на расстоянии R_i , формула (4.15).

а) Мощность воздушной кермы (Гр/с) на расстоянии R от источника рассчитывается по формуле:

$$\dot{K} = \frac{\Gamma_k \cdot A}{R^2}, \quad (4.14)$$

где Γ_k — керма-постоянная для данного радионуклида, аГр·м²/с·Бк; A — активность радионуклида на время измерения, Бк; R — расстояние от источника до точки измерения, м.

б) Мощность эквивалентной дозы γ -излучения (Зв/ч) на расстоянии R от источника рассчитывается по формуле:

$$H_{\text{расч}} = \frac{\Gamma_n \cdot A}{R^2}, \quad (4.15)$$

где Γ_n — полная гамма-постоянная радионуклида, аЗв·м²/с·Бк; A — активность радионуклида на время измерения, Бк; R — расстояние от источника до точки измерения, м.

с) Активность источника (Бк) на момент измерения определяется как

$$A = A_0 \cdot e^{\frac{(-0,63 \cdot t)}{T_{1/2}}}, \quad (4.16)$$

где A_0 — паспортная активность источника на момент его изготовления, Бк; $T_{1/2}$ — период полураспада, лет; t — время, прошедшее с момента изготовления источника до момента измерения, лет.

2. Распределите суспензию в чашки Петри, по 500 мкл в каждую. Чашки Петри поместите в бочку с источниками ИИ. Одну чашку Петри оставьте как контрольный образец.

3. Через 2 часа вытащите облученные образцы из бочек с ИИ.

4. Проведите подсчет клеток во всех группах.

5. Через 1 час проведите повторный количественный учет.

6. Сравните результаты облученных групп с контрольной группой.

7. Результаты занесите в табл. 4.2.

Таблица 4.2

Результаты измерения для разных активностей источника

№ источника	Число клеток в 1-м квадрате, шт.	Число клеток в 2-м квадрате, шт.	Число клеток в 3-м квадрате, шт.	Число клеток в 4-м квадрате, шт.	Число клеток в 5-м квадрате, шт.	Среднее число клеток, шт.	Число клеток в 1 мл суспензии, клеток/мл	Выживаемость, доли
Контроль								
^{241}Am								
^{37}Cs								
^{60}Co								

8. Постройте график зависимости среднего числа клеток от активности источника (Бк).

9. Отчет должен содержать:

- название работы;
- цель работы;
- краткие теоретические сведения, характеризующие взаимодействие ионизирующего излучения с веществом;
- экспериментальные результаты в виде таблиц и графиков;
- расчетные данные;
- аргументированные выводы по работе с анализом экспериментальных данных.

Отчет должен быть оформлен в соответствии с общими установленными правилами, сдается один на бригаду, защищается каждым членом бригады.

Лабораторная работа № 5.

Взаимодействие нейтронного излучения с микроорганизмами

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: исследовать влияние нейтронного излучения на популяцию дрожжевых клеток.

Взаимодействие нейтронов с веществом происходит в основном благодаря их взаимодействию с атомным ядром. Электромагнитное взаимодействие нейтрона с электронами определяется взаимодействием между их магнитными моментами и в большинстве случаев оказывается пренебрежимо мало.

Сечение взаимодействия нейтронов с ядром сильно зависит от энергии нейтронов и от нуклидного состава вещества.

Тканевая доза нейтронов обусловлена поглощенной энергией вторичного излучения, возникающего при взаимодействии нейтронов с тканью организма. Значимость тех или иных процессов взаимодействия нейтронов с тканью организма определяется составом ткани. Примерный химический состав ткани приведен в табл. 5.1.

Таблица 5.1

Химический состав биологической ткани

Элемент	Масса, %	Концентрация атомов, см ⁻³
Водород	10,0	$6,02 \cdot 10^{22}$
Углерод	18,0	$9,05 \cdot 10^{21}$
Азот	3,0	$1,28 \cdot 10^{21}$
Кислород	65,0	$2,45 \cdot 10^{22}$
Фосфор	1,0	$1,94 \cdot 10^{20}$
Кальций	1,5	$2,26 \cdot 10^{20}$
Другие элементы	1,5	$\sim 2,0 \cdot 10^{20}$

Для живой ткани характерно, что она состоит в основном из легких элементов. Самый легкий — водород — по числу атомов занимает первое место среди всех элементов ткани. Преобладание того или иного процессов взаимодействия нейтронов с веществом определенного химического состава полностью определяется энергией нейтронов. Из всех процессов взаимодействия деление тяжелых ядер под действием нейтронов не характерно для ткани и может наблюдаться лишь при наличии инкорпорированных делящихся веществ, таких, как уран, торий, плутоний и т. п. Остальные процессы могут происходить при взаимодействии нейтронов с тканью, хотя их роль различна в зависимости от энергии нейтронов.

В практике дозиметрии и защиты с точки зрения регистрации, оценки поглощенной дозы и выбора материала защиты рассматриваются в основном три группы нейтронов: тепловые, промежуточные и быстрые. Преобразование энергии нейтронов происходит в элементарных актах взаимодействия с ядрами атомов поглощающей среды. При этом процессы подразделяются на упругое и неупругое рассеяние, радиационный захват, расщепление ядер с вылетом заряженных частиц (ядерные реакции), деление ядер. Вероятность каждого процесса определяется микроскопическим сечением взаимодействия σ , зависящим от энергии нейтронов и атомного номера среды Z .

Рассмотрим поглощенную в ткани дозу нейтронов различных энергетических групп.

Медленные нейтроны с энергиями от тепловых до 1 кэВ. Для легких ядер основным видом взаимодействия этой группы нейтронов является упругое рассеяние. Из указанных выше элементов, взаимодействие медленных нейтронов с которыми приводит к реакции с вылетом заряженных частиц, для ткани имеет значение только ^{14}N . Следовательно, преобразование энергии медленных нейтронов в живой ткани происходит в результате упругого рассеяния и через реакцию $^{14}\text{N} (n, p) ^{14}\text{C}$. Ядра отдачи, возникающие в ткани при упругом рассеянии медленных ней-

тронов, в большинстве своем обладают энергией, недостаточной для ионизации, и их вклад в биологический эффект предполагается незначительным.

Рассеяние приводит к быстрому замедлению нейтронов до тепловых энергий. Тепловые нейтроны, которые образовались в результате замедления более высокоэнергетических нейтронов или попали в ткань извне, захватываются ядрами элементов ткани с образованием новых изотопов. Из всех реакций, протекающих при взаимодействии тепловых нейтронов с элементами ткани, наибольшее значение имеют две: радиационный захват ядрами водорода $^1\text{H} (n, \gamma) ^2\text{H}$ и уже упомянутая реакция $^{14}\text{N} (n, p) ^{14}\text{C}$, вероятность которой для тепловых нейтронов значительно выше, чем для нейтронов высоких энергий. Возникающие при радиационном захвате γ -кванты с энергией 2,23 МэВ, распределение поглощенной энергии между γ -излучением и протонами, образующимися в реакции на азоте, таково, что доза, обусловленная γ -излучением, примерно в 20 раз больше дозы, вызванной протонами, взаимодействуя с тканью, дает существенный вклад в дозу. В реакции на азоте образуются протоны с энергией 0,62 МэВ и радиоактивный углерод ^{14}C . Протоны имеют в ткани малый пробег и практически поглощаются в месте своего возникновения. Радиоактивный углерод ^{14}C распадается с вылетом β -частиц, обладающих средней энергией 0,05 МэВ. Вклад в дозу распада ^{14}C пренебрежимо мал.

Помимо указанных основных реакций, характерных для взаимодействия тепловых нейтронов с ядрами азота и водорода, идут реакции и на других элементах, входящих в состав ткани. Среди них можно назвать радиационный захват $^{14}\text{N} (n, \gamma) ^{15}\text{N}$, сопровождающийся испусканием γ -квантов с энергией около 0,73 МэВ, реакцию $^{31}\text{P} (n, \gamma) ^{32}\text{P}$ и др. Эти дополнительные реакции могут несколько увеличить дозу в тех тканях организма, где имеется повышенное содержание элемента, на ядрах которого возможна реакция захвата нейтрона. Так, реакция на фосфо-

ре увеличивает дозу в костной ткани. В целом дополнительные реакции незначительного увеличивают дозу, обусловленную основными реакциями на водороде и азоте. Весьма незначительную роль играют также радионуклиды, образующиеся в ткани под действием нейтронов.

Быстрые нейтроны. Основным процессом, определяющим поглощение энергии быстрых нейтронов в ткани, — упругое рассеяние. Почти вся поглощенная энергия распределяется между ядрами отдачи водорода (протоны отдачи), углерода, азота и кислорода. Роль ядер отдачи других элементов, входящих в состав ткани, незначительна.

$$E_i = \frac{2A_i}{(1 + A_i^2)} \cdot E_0, \quad (5.1)$$

где A — атомный номер вещества; E_0 — энергия налетающих нейтронов МэВ.

Вклад в поглощенную энергию нейтронов ядер отдачи углерода, азота и кислорода примерно одинаков, на долю протонов отдачи приходится 70–80 % всей поглощенной энергии быстрых нейтронов.

Преимущественная роль водорода при взаимодействии быстрых нейтронов с живой тканью обусловлена следующими факторами: наибольшее число ядер ткани составляют протоны; при взаимодействии с ядром водорода передается максимальная энергия нейтрона, а сечение рассеяния на ядрах водорода больше, чем на ядрах других элементов, входящих в состав ткани. Это позволяет иногда принимать в расчет только атомы водорода.

Ядра отдачи, возникающие при рассеянии нейтронов, имеют сравнительно небольшой пробег, и можно считать, что они поглощаются в месте своего возникновения. В этом случае поглощенная доза D равна керме K . Для моноэнергетических нейтронов

$$D \equiv K = \varphi \cdot t \cdot \sum_i (n_i \cdot \sigma_i \cdot \overline{E_i}), \quad (5.2)$$

где φ — плотность потока нейтронов; t — время облучения; n_i — концентрация ядер типа i в ткани; σ_i — сечение рассеяния на ядрах типа i ; $\overline{E_i}$ — средняя энергия, передаваемая ядру типа i в одном акте рассеяния.

Если φ означает плотность потока падающих нейтронов без учета их многократного рассеяния в облучаемом объекте, то дозу, вычисленную по формуле (5.2), иногда называют первоударной дозой, или дозой первого столкновения.

Если D_0 — доза на поверхности объекта, то доза на глубине

$$D_x = D_0 \cdot \exp\left(-\frac{x}{l}\right), \quad (5.3)$$

где l — средний свободный пробег нейтронов в ткани.

Часть быстрых нейтронов, попадающих в биологический объект, замедляется до тепловой скорости, поэтому суммарный эффект воздействия определяется дозой, обусловленной упругими взаимодействиями нейтронов с ядрами ткани, и дозой тепловых нейтронов, появившихся в результате замедления быстрых нейтронов. Относительный вклад дозы тепловых нейтронов невелик и уменьшается с увеличением энергии нейтронов. Так, для нейтронов с энергией 1 МэВ часть общей дозы, обусловленная тепловыми нейтронами, составляет 11 %.

Нейтроны промежуточных энергий. Типичное взаимодействие нейтронов этого диапазона энергий — упругое рассеяние. Возникающие при этом ядра отдачи, особенно протоны, способны производить ионизацию среды. Существенное значение имеют также реакции захвата замедлившихся нейтронов. Характерной особенностью взаимодействия нейтронов промежуточных энергий является наличие резонансных пиков сечения рассеяния на ядрах некоторых элементов ткани. Практически важно определять дозу нейтронов промежуточных энергий,

в то же время именно в этой области возникают максимальные трудности дозиметрии.

Максимальная по глубине фантома тканевая доза (D), создаваемая единичным флюенсом моноэнергетических нейтронов, положена в основу нормирования доз и представлена на рис. 5.1 (кривая 1).

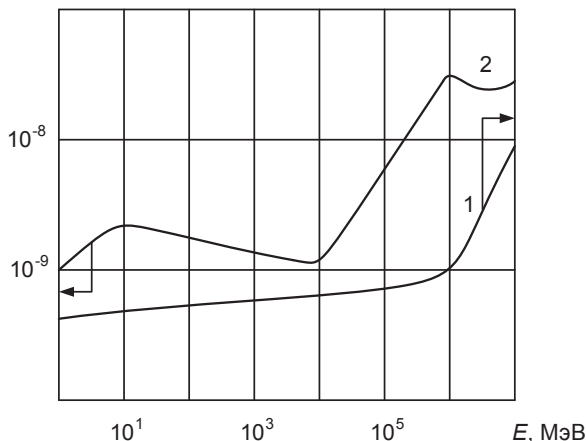


Рис. 5.1. Энергетическая зависимость максимальной по глубине фантома тканевой (1) и эквивалентной (2) доз единичного флюенса нейтронов

В случае биологической ткани поглощенная доза не определяет в полной мере реакцию облучаемого объекта на воздействие излучения. Биологическое воздействие ионизирующего излучения пропорционально не только поглощенной энергии, но и линейной потере энергии (ЛПЭ) ионизирующих частиц, которая характеризует степень «повреждения» биологического объекта различными частицами. Для сравнения биологических эффектов различных видов излучения служит понятие относительной биологической эффективности (ОБЭ).

ОБЭ оценивают сравнением дозы излучения, вызывающей определенный биологический эффект, с дозой стандартного

излучения, обуславливающий тот же эффект. Ранее в качестве стандартного принималось рентгеновское излучение, генерируемое при напряжении на трубке в 180–250 кВ.

Коэффициент качества — в радиобиологии усредненный коэффициент ОБЭ. Характеризует опасность данного вида излучения (по сравнению с γ -излучением). Чем коэффициент больше, тем опаснее данное излучение.

За эталон биологического действия ионизирующего излучения берут радиационное воздействие фотонного излучения ($E = 200$ кэВ) с линейной потерей энергии, равной 3,5 кэВ на 1 мкм пути в воде. Для этого вида излучения $K = 1$. Радиационное воздействие других видов излучения сравнивается с радиационным воздействием этого излучения. Если ЛПЭ частиц не выше указанной ЛПЭ, то K также принимают равным единице. Так, коэффициенты качества для нейтронов в зависимости от их энергии меняют свое значение от 5 до 20. В НРБ-09 вместо коэффициентов качества введены взвешивающие коэффициенты вида излучения w_R , имеющие те же значения. Поэтому для нахождения эквивалентной дозы H_T любого вида излучения необходимо поглощенную дозу в ткани умножить на соответствующий взвешивающий коэффициент:

$$H_T = \sum_R w_R \cdot D_{TR}, \quad (5.4)$$

где индекс R относится к определенному виду излучения.

В случае нейтронного излучения, когда спектр нейтронов известен, эквивалентная доза вычисляется умножением тканевой дозы на взвешивающий коэффициент для нейтронов каждой энергетической группы. Когда спектр нейтронов неизвестен, для простоты можно тканевую дозу от всех нейтронов умножить на $w_R = 20$ и получить верхнюю границу эквивалентной дозы.

Кривая 2 (рис. 5.1) показывает зависимость максимальной эквивалентной дозы от энергии нейтронов в поле единичного флюенса. Кривые 1 и 2 характеризуют энергетическую зави-

симось тканевой и эквивалентной доз для единичного флюенса нейтронов и используются на практике для градуировки дозиметров.

Эквивалентная доза измеряется в зивертах (Зв). Зиверт — единица измерения эквивалентной дозы любого вида излучения, создающая в биологической ткани такой же биологический эффект, как и поглощенная доза в 1 Гр образцового рентгеновского или γ -излучения.

Защитные свойства материалов от нейтронного излучения определяются их замедляющей и поглощающей способностью, степенью активации. Быстрые нейтроны наиболее эффективно замедляются веществами с малым атомным номером, такими как графит и водородсодержащие вещества (легкая и тяжелая вода, пластмассы, полиэтилен, парафин). Для эффективного поглощения тепловых нейтронов применяются материалы, имеющие большое сечение поглощения: соединения с бором — борная сталь, бораль, борный графит, карбид бора, а также кадмий и бетон (на лимонитовых и других рудах, содержащих связанную воду).

Вода используется не только как замедлитель нейтронов, но и как защитный материал от нейтронного излучения вследствие высокой плотности атомов водорода. После столкновений с атомами водорода быстрый нейтрон замедляется до тепловой энергии, а затем поглощается средой. При поглощении тепловых нейтронов ядрами водорода по реакции ${}^1\text{H}(n, \gamma){}^2\text{D}$ возникает захватное γ -излучение с энергией $E = 2,23$ МэВ. Захватное γ -излучение можно значительно снизить, если применить борированную воду. В этом случае тепловые нейтроны поглощаются бором по реакции $\text{B}(n, \alpha)\text{Li}$, а захватное излучение имеет энергию $E = 0,5$ МэВ. Водяную защиту выполняют в виде заполненных водой секционных баков из стали или других материалов.

Кадмий хорошо поглощает нейтроны с энергией меньше 0,4 эВ. Листовой кадмий толщиной 0,1 см снижает плотность потока тепловых нейтронов в 109 раз. При этом возникает захватное γ -излучение с энергией до 7,5 МэВ. Кадмий не обла-

дает достаточно хорошими механическими свойствами. Поэтому чаще применяют сплав кадмия со свинцом, который наряду с хорошими защитными свойствами от нейтронного и γ -излучений имеет лучшие механические свойства по сравнению с чистым кадмием.

Бетон является основным материалом для защиты от излучений, если масса и размер защиты не ограничиваются другими условиями. Бетон, применяющийся для защиты от излучений, состоит из заполнителей, связанных между собой цементом. В состав цемента в основном входят окислы кальция, кремния, алюминия, железа и легкие ядра, которые интенсивно поглощают γ -излучение и замедляют быстрые нейтроны в результате упругого и неупругого столкновений. Ослабление плотности потока нейтронов в бетоне зависит от содержания воды в материале защиты, которое определяется в основном типом используемого бетона. Поглощение нейтронов бетонной защитой может быть значительно увеличено введением соединения бора в состав материала защиты. Конструкция бетонной защиты может быть монолитной (для больших реакторов) или состоять из отдельных блоков (небольших реакторов).

Оборудование и материалы

1. Микроскоп МБИ-15.
2. Камера Горяева.
3. Метиленовая синь.
4. Нейтронный источник Pu-Be.
5. Сухие дрожжи.

В работе используется радионуклидный плутоний-бериллиевый источник ^9Be (α , n) ^{12}C . Его характеристики: поток 10^8 нейтронов/с; период полураспада 24060 лет; выход нейтронов $1,7 \cdot 10^6$ нейтронов/(с · Ки); число испускаемых γ -квантов на 1 нейтрон ~ 1 ; средняя энергия нейтронов 4,5 МэВ, а максимальная энергия — 10,74 МэВ.

Порядок выполнения работы

Перед выполнением лабораторной работы внимательно ознакомьтесь с культивированием клеток и их количественным учетом в лабораторной работе № 1. Проведите начальный количественный учет клеток, как описано в лабораторной работе № 1. Узнайте вариант задания у преподавателя.

Вариант 1

Воздействие медленными нейтронами на популяцию дрожжевых клеток. Для проведения эксперимента необходимо из всего потока нейтронов выделить медленные нейтроны, для этого в канал бочки с нейтронным источником $Pu-Be$ нужно поместить парафиновую пробку $d = 20$ см.

После того как медленные нейтроны выделены из всего потока, можно продолжать проведение лабораторной работы.

1. Распределите суспензию в 2 чашки Петри, по 500 мкл в каждую. Одну чашку Петри поместите в бочку с источниками ИИ. Вторую чашку Петри оставьте как контрольный образец.
2. Через 2 часа вытащите облученные образцы из бочки с ИИ.
3. Проведите подсчет клеток во всех группах.
4. Через 1 час проведите повторный количественный учет.
5. Сравните результаты облученной группы с контрольной.
6. Результаты занесите в табл. 5.2.

Таблица 5.2

Воздействие медленных нейтронов на микроорганизмы

	Контроль	Медленные нейтроны
Число клеток в большом квадрате камеры Горяева, шт.		
Число клеток в 1 мл суспензии, шт.		
Погрешность		
Выживаемость		

Вариант 2

Воздействие быстрыми нейтронами на популяцию дрожжевых клеток. Для проведения эксперимента необходимо из всего потока нейтронов выделить быстрые нейтроны, для этого на бочку с нейтронным источником Pu-Be нужно поместить Cd-лист.

1. Распределите суспензию в 2 чашки Петри, по 500 мкл в каждую. Одну чашку Петри поместите в бочку с источниками ИИ. Вторую чашку Петри оставьте как контрольный образец.
2. Через 2 часа вытащите облученные образцы из бочки с ИИ.
3. Проведите подсчет клеток во всех группах.
4. Через 1 час проведите повторный количественный учет.
5. Сравните результаты облученной группы с контрольной группой.
6. Результаты занесите в табл. 5.3.

Таблица 5.3

Результаты измерения для разных активностей источника

	Контроль	Быстрые нейтроны
Число клеток в большом квадрате камеры Горяева, шт.		
Число клеток в 1 мл суспензии, шт.		
Погрешность		
Выживаемость		

Вариант 3

Воздействие промежуточными нейтронами на популяцию дрожжевых клеток. Для проведения эксперимента необходимо из всего потока нейтронов выделить промежуточные нейтроны,

для этого на бочку с нейтронным источником Pu-Be нужно поместить парафиновую пробку $d = 10$ см и Cd-лист.

1. Распределите суспензию в две чашки Петри, по 500 мкл в каждую. Одну чашку Петри поместите в бочку с источниками ИИ. Вторую чашку Петри оставьте как контрольный образец.
2. Через 2 часа вытащите облученные образцы из бочки с ИИ.
3. Проведите подсчет клеток во всех группах.
4. Через 1 час проведите повторный количественный учет.
5. Сравните результаты облученной группы с контрольной группой.
6. Результаты занесите в табл. 5.4.

Таблица 5.4

Результаты измерения для разных активностей источника

	Контроль	Промежуточные нейтроны
Число клеток в большом квадрате камеры Горяева, шт.		
Число клеток в 1 мл суспензии, шт.		
Погрешность		
Выживаемость		

7. Отчет должен содержать:

- название работы;
- цели работы;
- краткие теоретические сведения, характеризующие взаимодействие ионизирующего излучения с веществом;
- экспериментальные результаты в виде таблиц;
- расчетные данные;
- аргументированные выводы по работе с анализом экспериментальных данных.

Лабораторная работа № 6.

Исследование комбинированного действия ионизирующего излучения и температуры на микроорганизмы

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: экспериментально исследовать комбинированное действие ионизирующего излучения с высокими и низкими температурами на жизнедеятельность микроорганизмов.

Как правило, биосфера не подвергается воздействию одного вредного фактора окружающей среды. Комбинированное действие различных факторов является отличительной чертой антропологической деятельности человека, и сочетание физических, химических, биологических факторов может оказывать синергетическое воздействие как на организменном уровне, так и на всю биоту.

Известно, что при сочетании воздействия различных факторов их вредное действие может суммироваться (независимое действие), ослабляться (антагонизм) либо усиливаться (синергизм). Синергическое взаимодействие факторов окружающей среды представляет особую опасность и привлекает внимание многих исследователей.

В связи с этим задача всестороннего анализа действия на живые организмы совместного влияния вредных агентов различной природы является в биологии особо актуальной.

Микроорганизмы широко используются в качестве модельных объектов для исследования общих закономерностей комбинированного действия физических факторов на клетку. Поэтому в современной микробиологии актуальными являются

вопросы изучения особенностей и механизмов влияния внешних физических факторов и комбинации этих факторов на состояние микроорганизмов для возможного использования этих воздействий в решении прикладных задач и внедрения новых технологий в медицине и биологии.

Данная лабораторная работа состоит из двух частей.

В первой части работы изучается влияние различных температурных режимов на жизнедеятельность микроорганизмов.

Вторая часть посвящена исследованию комбинированного действия ионизирующего излучения с высокими и низкими температурами на дрожжи.

Влияние ионизирующего излучения

Известно четыре вида взаимодействия излучения с веществом: сильное, электромагнитное, слабое и гравитационное. Для рассмотрения физических основ источников ионизирующего излучения достаточно проанализировать два вида — сильное и электромагнитное.

Сильное взаимодействие наиболее интенсивное и короткодействующее. Переносчиками сильного взаимодействия являются π -мезоны. При прохождении частиц через вещество сильное взаимодействие проявляется как в процессах непосредственного взаимодействия (захват одних частиц ядром и образованием других), так и в процессах распада ядер и частиц. Для него характерно большое сечение взаимодействия $10^{-24} \div 10^{-27} \text{ см}^2$. Сильное взаимодействие со средой происходит при прохождении через нее адронов (p , n , атомных ядер).

Электромагнитное взаимодействие — второе по интенсивности. Переносчиками электромагнитного взаимодействия являются фотоны. Оно определяет взаимодействие заряженных частиц и фотонов (рентгеновского и γ -диапазона) с атомами среды. Сечение взаимодействия с атомными ядрами существенно ниже, чем у сильного. Дальнодействующий характер взаимо-

действия в большей степени определяет доминирующую роль взаимодействия с атомами.

По механизму прохождения через вещество частицы условно делятся на четыре группы:

- тяжелые заряженные частицы (α , p , d , ионы);
- легкие заряженные частицы (e^- , e^+ , μ^\pm , π^\pm);
- рентгеновское и γ -излучение;
- нейтроны.

Биологическое действие ионизирующего излучения

Взаимодействие ионизирующего излучения со средой — одно из уникальных явлений окружающей среды, влияние которого на живой организм на первый взгляд совершенно неэквивалентно величине поглощаемой энергии. Действительно, летальная доза для млекопитающих составляет ~ 10 Гр, поглощаемая же при этом тканями и органами животных энергия могла бы повысить их температуру всего на тысячные доли градуса. Ясно, что само по себе такое повышение температуры не может вызвать столь выраженного эффекта поражения; в то же время непосредственные прямые нарушения в химических связях биомолекул в клетках и тканях, возникающие вслед за облучением, ничтожны.

Явления, происходящие на начальных физико-химических этапах лучевого воздействия, принято называть первичными, или пусковыми, поскольку именно они определяют весь дальнейший ход развития лучевых поражений.

В процессе повреждающего действия ИИ на организм условно можно выделить три этапа:

- первичное действие;
- влияние радиации на клетки;
- действие радиации на целый организм.

Процессы взаимодействия ИИ с веществом клетки, в результате чего образуются ионизированные и возбужденные атомы

и молекулы, являются первым этапом развития лучевого поражения. Ионизированные и возбужденные атомы и молекулы в течение 10^{-6} с взаимодействуют как между собой, так и с различными молекулярными системами, давая начало химически активным центрам (свободные радикалы, ионы, ионные радикалы и др.). В этот же период возможно образование разрывов связей в молекулах как за счет непосредственного взаимодействия с ионизирующим агентом, так и за счет внутри- и межмолекулярной передачи энергии возбуждения.

В дальнейшем имеют место реакции химически активных веществ с различными биологическими структурами, при которых отмечается как деструкция, так и образование новых, несвойственных для облучаемого организма соединений.

Первичным актом этого действия является возбуждение и ионизация молекул, в результате чего возникают свободные радикалы (прямое действие излучения) или начинается химическое превращение (радиолиз) воды, продукты которого (радикал OH , перекись водорода — H_2O_2) вступают в химическую реакцию с молекулами биологической системы.

Первичные процессы ионизации не вызывают больших нарушений в живых тканях. Повреждающее действие излучения связано с вторичными реакциями, при которых происходит разрыв связей внутри сложных органических молекул, например, SH -групп в белках, хромофорных групп азотистых оснований в ДНК, ненасыщенных связей в липидах.

Влияние ионизирующего излучения на клетки обусловлено взаимодействием свободных радикалов с молекулами белков, нуклеиновых кислот и липидов, когда вследствие всех этих процессов образуются органические перекиси и возникают быстропротекающие реакции окисления. В результате перекисного окисления накапливается множество измененных молекул, из-за чего начальный радиационный эффект многократно усиливается. Все это отражается, прежде всего, на структуре биологических мембран: меняются их сорбционные свойства и повышается проницаемость.

Высвобождающиеся гидролитические ферменты могут путем простой диффузии достичь любой органеллы клетки, в которую они легко проникают благодаря повышению проницаемости мембран. Под действием этих ферментов происходит дальнейший распад макромолекулярных компонентов клетки, в том числе нуклеиновых кислот, белков. Разобщение окислительного фосфорилирования в результате выхода ряда ферментов из митохондрий, в свою очередь, приводит к угнетению синтеза АТФ, а отсюда — и к нарушению биосинтеза белков. Происходит инактивация ферментов, разрушение мембранных структур, ядерного аппарата.

Таким образом, в основе радиационного поражения клетки лежит нарушение ультраструктур клеточных органелл и связанные с этим изменения обмена веществ.

ИИ действует на клетки тем сильнее, чем они моложе и менее дифференцированы.

Повреждающее действие ИИ на клетки при достаточно высоких дозах завершается гибелью. Гибель клетки в основном является результатом подавления митотической активности и необратимого нарушения хромосомного аппарата клетки, но возможна и интерфазная гибель (вне периода митоза) из-за нарушения метаболизма клетки и интоксикации упомянутыми выше радиотоксинами.

Радиоустойчивость различных организмов колеблется в широких пределах, причем микроорганизмы значительно радиоустойчивее высших организмов (в сотни и тысячи раз). Наиболее устойчивы к действию ИИ споры бактерий, затем грибы и дрожжи и далее бактерии.

Последующие этапы развития лучевого поражения проявляются в нарушении обмена веществ в биологических системах с изменением соответствующих функций. У высших организмов это протекает на фоне нейрогуморальной реакции на развитие нарушения.

Биологические эффекты малых доз облучения

Оценивая биологическое последствие облучения организмов, удобно делить их на летальные (возникающие в результате действия излучений в больших дозах), сублетальные (нелетальные), инициируемые воздействие ИИ в малых и средних дозах.

Биологический ответ на облучение в нелетальных дозах имеет немонотонный характер (рис. 6.1).

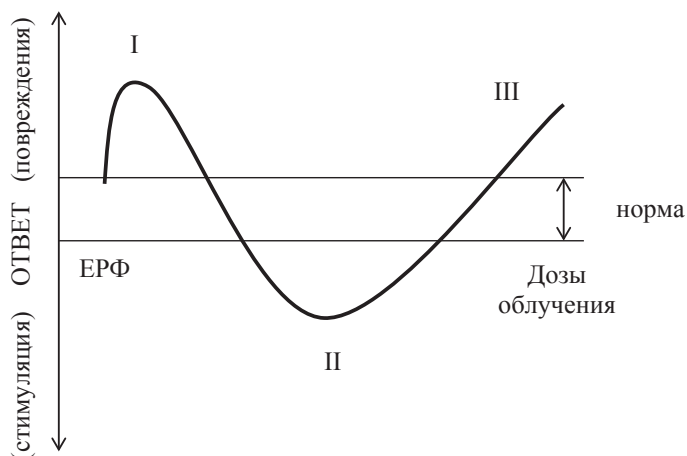


Рис. 6.1. Биологические эффекты облучения организмов в сублетальных дозах:

I — эффекты облучения в «сверхмалых» дозах; II — эффекты облучения в малых дозах; III — развитие структурно-функциональных повреждений при облучении в «средних сублетальных» дозах

Численные физические величины диапазона малых доз для разных организмов сильно различаются.

Естественный радиационный фон — «ультрамалые дозы» природного радиационного фона (~ 1 мЗв/год) — представляет собой низший уровень наносимого ионизирующими излучениями организму вреда без дополнительного облучения.

Существует ряд экспериментов, в которых описано замедление скорости деления клеток микроорганизмов при снижении внешнего ЕРФ. Такие исследования подтвердили выводы о положительной роли ЕРФ в жизнедеятельности организмов.

Эффект «гиперрадиочувствительности» представляет собой всплеск повреждений при воздействии «сверхмалыми» дозами (от ЕРФ до $\sim 5\text{--}20$ сГр). Происходит нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза, аберрации хромосом, выход клеток с микроядрами и другие показатели. Данный эффект продемонстрирован во многих опытах. Показано, что в основе его лежат нарушения конкурентных отношений между про- и антиоксидантами в окислительно-восстановительном гомеостазе. Эти изменения наблюдаются как при кратковременном, так и пролонгированном облучении в сверхмалых дозах.

Радиационный гормезис — это неспецифический эффект воздействия на живые организмы в малых дозах, вызывающих изменения, диаметрально противоположные повреждающим эффектам при воздействии в больших дозах. Оказывает стимулирующее действие на рост, развитие и жизнедеятельность клеток.

В области «средних сублетальных» доз начинается участок с прямой зависимостью ответа (размера повреждения) от величины дозы облучения.

Механизм клеточного восстановления от радиационных повреждений

В клетках функционирует сложнейший комплекс ферментных систем, поддерживающих структурную целостность генома. К одной из них относят разнообразные ферменты репарации ДНК, распознающие дефекты ее структуры, «ремонтирующие» ее при лучевых повреждениях путем специфического устранения различных повреждений и восстановления структуры и функции ДНК, а вместе с тем и нормального клеточного деления.

Влияние температуры на жизнедеятельность микроорганизмов

Температура среды — один из основных факторов, определяющих возможность и интенсивность развития микроорганизмов. Каждая группа микроорганизмов может развиваться лишь в определенных пределах температуры: для одних эти пределы узкие, для других — относительно широкие и исчисляются десятками градусов.

Влияние высоких температур

Превышение температуры среды над оптимальной сказывается на микроорганизмах более неблагоприятно, чем ее понижение. Отношение различных микроорганизмов к температурам, превышающим максимальную для их развития, характеризует их термоустойчивость. У разных микроорганизмов она неодинакова. Температуры, превышающие максимальную, вызывают явление «теплового шока». При непродолжительном пребывании в таком состоянии клетки могут дезактивироваться, а при длительном — наступает их отмирание. Большинство беспоровых бактерий отмирает в течение 15–30 мин при нагревании во влажном состоянии до + (60...70) °C, а при нагревании до + (80...100) °C — в течение времени от нескольких секунд до 1–2 мин. Дрожжи и мицелиальные грибы погибают также довольно быстро при температуре + (50...60) °C.

Отмирание микроорганизмов при нагревании во влажной среде наступает вследствие происходящих необратимых изменений в клетке. Основными из них являются денатурация белков и нуклеиновых кислот клетки, а также инактивация ферментов и возможное повреждение цитоплазматической мембраны.

При воздействии на клетки «сухого жара» (без влаги) гибель происходит в результате активных окислительных процессов и нарушения клеточных структур. На губительном действии

высокой температуры основан один из важнейших и широко применяемых в микробиологической и медицинской практике приемов — стерилизация.

Влияние низких температур

Холодоустойчивость различных микроорганизмов колеблется в широких пределах. При температуре среды ниже оптимальной снижается скорость размножения микроорганизмов и интенсивность их жизненных процессов.

Многие микроорганизмы не способны развиваться при температуре ниже нуля. Некоторые микроорганизмы временно могут выдерживать очень низкие температуры. Кишечная и брюшнотифозная палочки в течение нескольких дней не погибают даже при температурах — (172 ...190) °С. Споры бактерий сохраняют способность к прорастанию даже после 10-часового пребывания при —252 °С (температура жидкого водорода). Некоторые мицелиальные грибы и дрожжи сохраняют жизнеспособность после воздействия температуры —190 °С (температура жидкого воздуха) в течение нескольких дней, а споры мицелиальных грибов — в течение нескольких месяцев.

Причинами смерти микроорганизмов при действии низких температур являются: нарушение обмена веществ; увеличение осмотического давления среды вследствие вымораживания воды; в клетках могут образоваться кристаллики льда, разрушающие клеточную стенку.

При температурах ниже минимальной микроорганизмы не размножаются, их активная жизнедеятельность приостанавливается, многие из них неопределенно долгое время остаются жизнеспособными, переходя в анабиотическое состояние. При повышении температуры они вновь возвращаются к активной жизни. Однако некоторые микроорганизмы в таких условиях скоро погибают. Отмирание происходит значительно медленнее, чем под действием высоких температур.

Комбинированное действие ионизирующего излучения и температуры

Влияние ионизирующего излучения и высоких температур

Комбинированное действие повышенной температуры и ионизирующей радиации нашло широкое применение в онкологии, поскольку гипертермия является сильным модификатором радиочувствительности клеток. Гипертермия позволяет при меньших дозах ионизирующей радиации добиться некроза опухоли, при этом часто наблюдается явление синергизма. В лечебных целях гипертермию создают местно, в районе опухоли.

Закономерности комбинированного действия ионизирующего излучения и гипертермии достаточно широко изучены для микроорганизмов.

Были проведены экспериментальные исследования восстановления дрожжевых клеток после последовательного и одновременного терморadiационного воздействия.

Результаты экспериментальных исследований показывают, что при последовательном действии гипертермии с ИИ с увеличением продолжительности действия гипертермии эффективность комбинированного воздействия прогрессивно возрастала. При этом как объем, так и скорость восстановления уменьшались с увеличением тепловой нагрузки. Эти данные подтверждают наиболее распространенную точку зрения об участии процессов восстановления в механизме синергического взаимодействия.

Повышение доли невосстанавливающихся дрожжевых клеток с увеличением температуры, при которой происходило облучение ионизирующим излучением, сопровождалось увеличением доли клеток, погибающих без деления и не способных к восстановлению.

При фиксированной мощности дозы ионизирующего излучения синергическое усиление радиационного эффекта ги-

пертермией происходит лишь в определенном температурном диапазоне. При температурах, выходящих за пределы этого диапазона, взаимодействие агентов характеризуется аддитивностью.

Применение ионизирующего излучения и гипертермии характеризуется синергическим взаимодействием при определенном соотношении повреждений, индуцируемых обоими агентами. Максимальный синергизм проявляется при одновременном применении агентов. Увеличение интервала времени между облучением и гипертермическим воздействием приводит к уменьшению синергического эффекта.

Влияние ионизирующего излучения и низких температур

В экспериментах по исследованию влияния совместного действия ионизирующего излучения и низких температур было замечено, что чувствительность к облучению клеток, замороженных при $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, была снижена наполовину. Вместе с тем клетки, замороженные до $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ и затем согретые, обладали обычной чувствительностью к облучению при $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Следовательно, процесс замораживания до $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ и оттаивания не вносил изменений в их структуры. Чувствительность к облучению снижалась еще на 25 % при понижении температуры от -10 до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Однако в интервале от -30 до $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$ наблюдалось поразительное повышение чувствительности к облучению. При этом во всех опытах была принята поправка на число клеток, погибших во время замораживания и оттаивания.

Повышенную устойчивость замороженных клеток к ионизирующему излучению объясняли тем, что токсические продукты облучения в известной степени теряют способность диффундировать в цитоплазму и инактивировать наиболее чувствительные или жизненно важные компоненты клеток. Можно было бы предположить, что по мере уменьшения температуры снижается и скорость диффузии, а одновременно с этим ослабевает

и губительное действие ионизирующего излучения. Результаты, полученные в экспериментах, не подтвердили этого предположения, в связи с чем возникла необходимость исследовать влияние замораживания на дрожжевые клетки при разных скоростях охлаждения и различных конечных температурах.

Микроскопические исследования по охлаждению с различной скоростью взвеси дрожжей и наблюдение процесса образования льда объясняют разную чувствительность дрожжевых клеток к излучению. При быстром замораживании при температуре от -2 до -10 °C происходила внеклеточная кристаллизация льда и клетки постепенно сжимались. При быстром замораживании при -78 и -190 °C кристаллы льда появлялись и внутри клеток. Разной локализацией кристаллов льда можно объяснить неодинаковую чувствительность дрожжевых клеток, охлажденных до различных температур, к рентгеновским лучам.

При действии ИИ в замороженных клетках возникают свободные радикалы в равных количествах на каждую единицу объема воды, независимо от того, находится ли она в жидком состоянии или в замерзшем, внутри или вне клетки. Если эти свободные радикалы и их продукты образовались во льду, они, вероятно, будут фиксироваться в месте своего возникновения и смогут лишь постепенно, очень медленно диффундировать отсюда. При вымерзании большого объема воды вне клеток фиксированные во внеклеточных пространствах свободные радикалы, высвобождаясь при оттаивании, будут растворяться во внешней среде и не смогут причинить вреда уязвимым и жизненно важным частям клеток. Предполагается, что уменьшение чувствительности дрожжевых клеток к облучению при температурах от 0 до -30 °C обусловлено тем, что по мере понижения температуры увеличивается объем воды, вымерзающей вне клеток.

В то же время при быстром охлаждении до температур ниже -30 °C какая-то часть воды в цитоплазме вымерзает внутри самих клеток. Объем внутриклеточного льда зависит от температуры замораживания. При температуре -72 °C вся клеточная

вода может быть заморожена *in situ*. Во время облучения свободные радикалы фиксируются внутри клеток и после оттаивания могут нанести повреждение жизненно важным и уязвимым частям клеток. Этим, по-видимому, можно объяснить тот факт, почему дрожжевые клетки, быстро охлажденные до $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$ и облученные при этой температуре, были так же чувствительны к рентгеновским лучам, как и клетки, облученные в жидкой фазе или при температуре, близкой к $0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Оборудование и материалы

1. Микроскоп МБИ-15.
2. Счетная камера Горяева.
3. Краситель метиленовый синий.

Пункты 1–3 подробнее описаны в лабораторной работе № 1.

4. В экспериментах по изучению влияния гипертермии на микроорганизмы для нагрева суспензии использовать электрический сушильный шкаф, позволяющий проводить нагрев до $100\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5. Для контроля температуры использовать термометр технический ТТЖ-М, позволяющий проводить измерения от 0 до $100\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Объекты исследования

В экспериментах будут использованы дрожжи вида *Saccharomyces cerevisiae* штамм JAY291. Оптимальный диапазон температур для размножения данного штамма дрожжей составляет $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Подробнее о дрожжах описано в лабораторной работе № 1.

Порядок выполнения работы

1. Исследование влияния высоких и низких температур

Приготовьте суспензию дрожжей (минимум за 5 часов до проведения лабораторной работы, чтобы дрожжи находились в стационарной фазе роста).

1.1. Для приготовления препарата разведите 0,48 г сухих дрожжей в 240 мл теплой воды ($\sim 45\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$), добавьте 9,99 г сахара, тщательно перемешайте и поставьте в теплое место.

1.2. Перед проведением экспериментов готовую дрожжевую суспензию тщательно перемешайте и разделите на 4 емкости по 60 мл.

1.3. Одна группа микроорганизмов является контрольной, ее необходимо поддерживать при постоянной температуре $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (комнатной температуре).

1.4. Вторую группу поместите в холодильную камеру на 15 мин, после этого измерьте температуру смеси.

1.5. Третью группу микроорганизмов поместите в металлическую емкость, с помощью электрического сушильного шкафа проведите нагрев суспензии до температуры $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, используя термометр, поддерживайте данную температуру в течение 15 мин.

1.6. Четвертую группу дрожжей нагрейте таким же способом до температуры $80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.7. После каждого опыта проведите количественный учет микроорганизмов. Методика подсчета клеток подробно описана в лабораторной работе № 1.

1.8. Полученные данные занесите в табл. 6.1.

Таблица 6.1

**Влияние высоких и низких температур
на жизнедеятельность микроорганизмов**

Температура, $^{\circ}\text{C}$	Контроль			
Число клеток в большом квадрате камеры Горяева, шт.				
а, шт.				
Погрешность				

1.9. Для всех экспериментов рассчитайте погрешность.

1.10. Постройте кривую выживаемости дрожжевых клеток в зависимости от температуры. На оси абсцисс откладывается температура, на оси ординат — выживаемость (количество клеток, полученное в опыте, нормированное на количество клеток контрольной группы, умноженное на 100 %). На полученной кривой постройте планки погрешностей.

1.11. По полученным данным сделайте вывод о влиянии различных температур на жизнедеятельность дрожжей. С чем связаны полученные результаты?

2. Комбинированное действие ионизирующего излучения с высокими и низкими температурами

2.1. Приготовьте суспензию дрожжей (минимум за 5 часов до проведения лабораторной работы, чтобы дрожжи находились в стационарной фазе роста).

2.2. Перед проведением экспериментов готовую дрожжевую суспензию тщательно перемешайте и разделите на 4 емкости по 60 мл.

2.3. Одна группа микроорганизмов является контрольной, ее необходимо поддерживать при постоянной температуре 22 °С (комнатной температуре).

2.4. Вторую группу поместите в холодильную камеру на 15 мин, после этого измерьте температуру смеси.

2.5. Третью группу микроорганизмов поместите в металлическую емкость, с помощью электрического сушильного шкафа проведите нагрев суспензии до температуры 50 °С, используя термометр, поддерживайте данную температуру в течение 15 мин.

2.6. Четвертую группу дрожжей нагрейте таким же способом до температуры 80 °С.

2.7. После проведения экспериментов каждую группу микроорганизмов разделите на две подгруппы, одну из подгрупп каждой группы поместите в источник ионизирующего излучения ²⁴¹Am на два часа.

2.8. Проведите количественный учет микроорганизмов для всех подгрупп. Методика подсчета клеток подробно описана в лабораторной работе № 1.

2.9. Полученные данные занесите в табл. 6.2.

2.10. Для всех экспериментов рассчитайте погрешность.

2.11. Постройте кривые выживаемости дрожжевых клеток в зависимости от температуры без воздействия ионизирующего излучения и с воздействием ионизирующего излучения. На оси абсцисс откладывается температура, на оси ординат — выживаемость (количество клеток, полученное в опыте, нормированное на количество клеток контрольной группы, умноженное на 100 %). На полученных кривых постройте планки погрешностей.

2.12. Сравните полученные данные, сделайте вывод о влиянии предварительного воздействия разными температурами на чувствительность дрожжевых клеток к последующему действию ионизирующего излучения. С чем могут быть связаны полученные результаты?

Таблица 6.2

**Комбинированное действие ионизирующего излучения
и разных температур**

Температура, °С	Контроль							
	Без ИИ	С ИИ	Без ИИ	С ИИ	Без ИИ	С ИИ	Без ИИ	С ИИ
Число клеток в большом ква- драте камеры Го- ряева, шт.								
Среднее число клеток, шт.								
Погрешность								

Отчет

После выполнения лабораторной работы необходимо подготовить отчет, который должен содержать:

- основные используемые формулы;
- экспериментальные результаты в виде таблиц и графиков;
- необходимые справочные данные, расчет погрешности измерений;
- аргументированные выводы по работе с анализом экспериментальных данных.

Отчет должен быть оформлен в соответствии с общими установленными правилами, сдается один на бригаду, защищается каждым членом бригады.

Лабораторная работа № 7.

Исследование комбинированного действия ионизирующего и электромагнитного излучения на микроорганизмы

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: экспериментально исследовать комбинированное действие ионизирующего и электромагнитного излучения на микроорганизмы.

Данная лабораторная работа состоит из трех частей.

В первой части лабораторной работы изучается влияние электромагнитного излучения СВЧ-диапазона на жизнедеятельность дрожжей.

Вторая часть работы посвящена изучению теплового и нетеплового действия СВЧ-излучения на микроорганизмы.

В третьей части работы проводится исследование комбинированного действия ионизирующего и электромагнитного излучения на дрожжи.

Воздействие электромагнитного излучения

Электромагнитные излучения являются физическим фактором среды, который оказывает существенное влияние на различные живые организмы. Электромагнитное излучение — это возмущение электромагнитного поля, распространяющееся в пространстве и несущее с собой энергию и импульс без переноса вещества.

В настоящее время происходит интенсивное развитие отраслей промышленности, использующих электромагнитное излу-

чение. Поэтому практически повсеместно биосфера находится под воздействием различных электромагнитных излучений.

В связи с развитием техники, радиосвязи, телевидения, радиолокации и радионавигации в настоящее время электромагнитные излучения разделяют на три группы: поля естественного происхождения, излучения биологической природы и поля искусственного происхождения.

Мощные электромагнитные поля естественного происхождения генерирует Солнце. Диапазон излучений различен: радиоволны сверхвысокочастотного и крайне высокочастотного диапазонов, инфракрасные, световые и ультрафиолетовые лучи.

Известно, что различные по происхождению электромагнитные излучения разной мощности и интенсивности обладают значительным влиянием на биологические объекты. Среди электромагнитных излучений высоких частот СВЧ-диапазон оказывает наиболее ярко выраженное воздействие на живые организмы.

СВЧ-излучение включает в себя дециметровый, сантиметровый и миллиметровый диапазоны радиоволн (длина волны от 1 м — частота 300 МГц, до 1 мм — 300 ГГц).

С развитием техники количество источников электромагнитных волн СВЧ-диапазона ежегодно увеличивается. К приборам, индуцирующим электромагнитные поля, можно отнести: передатчики навигационной службы, высокочастотные нагреватели, передатчики радио и телевидения, многие медицинские диагностические и лечебные приборы, мобильные телефоны, микроволновые печи, микроволновые наземные и спутниковые радары и многое другое. Все это создает угрозу электромагнитного загрязнения окружающей среды.

Биологическое действие СВЧ-излучения

В механизме действия СВЧ-излучения выделяют тепловые и нетепловые эффекты.

Механизм теплового воздействия состоит в том, что поглощенная средой энергия вызывает изменение пространственной ориентации дипольных молекул воды, прежде всего усиление их колебаний. Они передают часть энергии окружающим молекулам, также приходящим в движение, в результате чего энергия СВЧ переходит в тепловую, благодаря чему и происходит нагревание объекта. Этот процесс может привести либо к патологическим сдвигам в организме, либо к его гибели. Чем больше в облучаемом объекте полярных молекул H_2O , тем сильнее эффект.

Тепловой эффект зависит от физических параметров ЭМИ: интенсивности и режима излучения, длины волны, продолжительности и характера облучения организма, площади облучаемой поверхности.

Физическая природа «нетепловых эффектов» понятна в гораздо меньшей степени. Предполагается, что электромагнитные волны могут влиять на биологические процессы, разрывая водородные связи и влияя на ориентацию макромолекул ДНК и РНК, а также изменяя содержание и биологическую активность ферментов, динамическое постоянство ионных соотношений, физико-химические свойства и биологическую активность белков, проницаемость клеточных мембран и мембранного потенциала.

Доказано, что наличие внешнего ЭМИ изменяет величину тока ионов через мембрану клеток микроорганизмов до 5 % от исходного.

В литературе известно применение электромагнитного излучения СВЧ-диапазона в микробиологии. Углубленные лабораторные исследования показали, что микроволновое излучение обладает стерилизующим действием в отношении стафилококков, кишечных палочек и других микроорганизмов. Поэтому оно находит применение для подавления роста микроорганизмов и стерилизации различных объектов.

Действие СВЧ-излучения на клетки и организм в целом является предметом тщательного изучения. Использование

СВЧ-энергии в медицинской, пищевой и микробиологической промышленности обусловлено спецификой СВЧ-нагрева и облучаемых объектов, а именно возможностью нагревать одновременно весь объем, регулировать скорость поглощения энергии и температуру образца.

Влияние ионизирующего излучения

Подробно об ионизирующем излучении и о его влиянии на биологические объекты изложено в предыдущих лабораторных работах.

Комбинированное действие ионизирующего и электромагнитного излучения

На многих промышленных предприятиях распространено сочетанное воздействие рентгеновского и электромагнитного излучения СВЧ и других диапазонов. Поэтому нужно знать о механизмах комбинированного действия этих факторов.

При комбинированном действии различных факторов их вредное действие может суммироваться (независимое действие), ослабляться (антагонизм), либо усиливаться (синергизм). Синергическое взаимодействие факторов окружающей среды представляет особую опасность и привлекает внимание многих исследователей.

Имеются обширные экспериментальные данные по комбинированному действию ионизирующего и СВЧ-излучения на выживаемость лабораторных животных. В этих работах в зависимости от дозы и интенсивности воздействующих агентов наблюдались все возможные типы взаимодействия повреждающих факторов — аддитивность, антагонизм и синергизм.

Общие закономерности проявления эффектов комбинированных воздействий можно сформулировать следующим образом.

Чаще всего наблюдается аддитивное сложение повреждений, индуцированных каждым агентом. Наличие синергического или антагонистического взаимодействия зависит от соотношения доз и/или интенсивностей воздействующих агентов.

Независимо от природы действующих агентов и анализируемого биообъекта синергизм максимален при одновременном применении агентов. Увеличение интервала времени между воздействиями приводит к прогрессивному уменьшению синергического эффекта.

При вариации доз обоих агентов существует определенное (оптимальное) соотношение доз воздействующих агентов, при котором синергизм максимален. Любое отклонение этого соотношения от оптимального приводит к снижению синергического взаимодействия.

Наиболее распространенные из предполагаемых механизмов синергического взаимодействия связаны с подавлением способности биообъектов к пострадикационному восстановлению в условиях комбинированных воздействий или с формированием дополнительных эффективных повреждений за счет взаимодействия субповреждений, индуцированных каждым агентом.

Особый интерес для проблемы малых доз и интенсивностей воздействующих агентов представляет зависимость синергизма от интенсивности применяемых агентов, выявляемая на самых различных объектах (вирусах, спорах бактерий, дрожжевых клетках и клетках млекопитающих) с применением разнообразных воздействующих факторов (ионизирующее излучение, акустические колебания, гипертермия). Совокупность данных показывает, что, во-первых, чем меньше интенсивность одного из используемых в комбинации агентов, тем меньше должна быть интенсивность другого фактора для их максимального синергического взаимодействия. Во-вторых, для каждой интенсивности исследуемого физического фактора окружающей среды существует температура (или интенсивность другого агента), для которой синергизм максимален.

Оборудование и материалы

1. Микроскоп МБИ-15.
2. Счетная камера Горяева.
3. Краситель метиленовый синий.
4. В экспериментах по изучению влияния гипертермии на микроорганизмы для нагрева суспензии используется электрический сушильный шкаф, позволяющий проводить нагрев до 100 °С.
5. Для контроля температуры использовать термометр технический ТТЖ-М, позволяющий проводить измерения от 0 до 100 °С.
6. В опытах по исследованию влияния электромагнитного излучения на микроорганизмы используется СВЧ-печь с рабочей частотой излучения 2450 МГц и мощностью в диапазоне от 90 до 800 Вт.

Объекты исследования

В экспериментах использованы дрожжи вида *Saccharomyces cerevisiae* штамма JAY291. Оптимальный диапазон температур для размножения данного штамма дрожжей составляет 20–25 °С.

Подробнее о дрожжах — в лабораторной работе № 1.

Порядок выполнения работы

1. Исследование влияния ЭМИ СВЧ-диапазона на дрожжи
 - 1.1. Приготовьте суспензию дрожжей (минимум за 5 часов до проведения лабораторной работы, чтобы дрожжи находились в стационарной фазе роста). Для приготовления препарата разведите 0,48 г сухих дрожжей в 240 мл теплой воды (~45–50 °С), добавьте 9,99 г сахара, тщательно перемешайте и поставьте в теплое место.

1.2. Перед проведением экспериментов готовую дрожжевую суспензию тщательно перемешайте и разделите на 4 части по 60 мл.

1.3. Одна группа микроорганизмов является контрольной, ее необходимо поддерживать при постоянной температуре 22 °С (комнатной температуре).

1.4. Вторую группу поместите в микроволновую печь на 30 секунд, мощность воздействия 180 Вт.

1.5. На третью группу произведите воздействие СВЧ-излучения мощностью 360 Вт в течение 30 секунд.

1.6. На четвертую группу — 600 Вт в течение 30 секунд.

1.7. После каждого опыта проведите количественный учет микроорганизмов. Методика подсчета клеток подробно описана в лабораторной работе № 1.

1.8. Полученные данные занесите в табл. 7.1.

Таблица 7.1

Влияние СВЧ-излучения на жизнедеятельность дрожжей

Мощность СВЧ-излучения	Контроль	180 Вт	360 Вт	600 Вт
Число клеток в большом квадрате камеры Горяева, шт.				
Среднее число клеток, шт.				
Погрешность				

1.9. Для всех экспериментов рассчитайте погрешность.

1.10. Постройте кривую выживаемости дрожжевых клеток в зависимости от мощности СВЧ-излучения. На оси абсцисс откладывается мощность СВЧ-излучения, на оси ординат — выживаемость (количество клеток, полученное в опыте, нормированное на количество клеток контрольной группы, ум-

ноженное на 100 %). На полученной кривой постройте планки погрешностей.

1.11. По полученным данным сделайте вывод о влиянии различных мощностей СВЧ-излучения на жизнедеятельность дрожжей. С чем связаны полученные результаты?

2. Изучения теплового и нетеплового действия СВЧ

2.1. Приготовьте суспензию дрожжей (минимум за 5 часов до проведения лабораторной работы, чтобы дрожжи находились в стационарной фазе роста). Для приготовления препарата разведите 0,96 г сухих дрожжей в 480 мл теплой воды (~45–50 °C), добавьте 19,98 г сахара, тщательно перемешайте и поставьте в теплое место.

2.2. Перед проведением экспериментов готовую дрожжевую суспензию тщательно перемешайте и разделите на 8 частей по 60 мл.

2.3. Одна группа микроорганизмов является контрольной, ее необходимо поддерживать при постоянной температуре 22 °C (комнатной температуре).

2.4. Вторую группу поместите в микроволновую печь на 30 секунд, мощность воздействия 180 Вт.

2.5. На третью группу произведите воздействие СВЧ-излучения мощностью 360 Вт в течение 30 секунд.

2.6. На четвертую группу — 600 Вт в течение 30 секунд.

2.7. Измерьте температуры, до которых происходил нагрев суспензий при воздействии СВЧ-излучения.

2.8. Нагрейте пятую, шестую и седьмую группу микроорганизмов до этих температур соответственно.

2.9. После каждого опыта проведите количественный учет микроорганизмов. Методика подсчета клеток подробно описана в лабораторной работе № 1.

2.10. Полученные данные занесите в табл. 7.2.

2.11. Для всех экспериментов рассчитайте погрешность.

2.12. Постройте кривую выживаемости дрожжевых клеток в зависимости от мощности СВЧ-излучения и кривую выжи-

ваемости в зависимости от температуры. Сравните полученные кривые. На этих кривых постройте планки погрешностей.

2.13. Сделайте вывод о вкладе тепловых и нетепловых эффектов в механизм действия СВЧ-излучения. С чем могут быть связаны полученные результаты?

Таблица 7.2

Тепловые и нетепловые эффекты в механизме действия СВЧ-излучения

№ эксперимента	1	2	3	4
<div> <div>Мощность СВЧ</div> <div>Температура</div> </div>	<div> <div>Кон-троль</div> <div>22 °С</div> </div>	<div> <div>180</div> <div>Вт</div> </div>	<div> <div>360</div> <div>Вт</div> </div>	<div> <div>600</div> <div>Вт</div> </div>
Число клеток в боль- шом квадрате камеры Горяева, шт.				
Среднее число кле- ток, шт.				
Погрешность				

3. Комбинированное действие ионизирующего и СВЧ-излучения

3.1. Приготовьте суспензию дрожжей (минимум за 5 часов до проведения лабораторной работы, чтобы дрожжи находились в стационарной фазе роста). Для приготовления препарата разведите 0,48 г сухих дрожжей в 240 мл теплой воды (~45–50 °С), добавьте 9,99 г сахара, тщательно перемешайте и поставьте в теплое место.

3.2. Перед проведением экспериментов готовую дрожжевую суспензию тщательно перемешайте и разделите на 4 емкости по 60 мл.

3.3. Одна группа микроорганизмов является контрольной, ее необходимо поддерживать при постоянной температуре 22 °С (комнатной температуре).

3.4. Вторую группу поместите в микроволновую печь на 30 секунд, мощность воздействия 180 Вт.

3.5. На третью группу произведите воздействие СВЧ-излучения мощностью 360 Вт в течение 30 секунд.

3.6. На четвертую группу — 600 Вт в течение 30 секунд.

3.7. После проведенных экспериментов каждую группу микроорганизмов разделите на две подгруппы, одну из подгрупп каждой группы поместите в источник ионизирующего излучения ^{241}Am на два часа.

3.8. Проведите количественный учет микроорганизмов для всех подгрупп. Методика подсчета клеток подробно описана в лабораторной работе № 1.

3.9. Полученные данные занесите в табл. 7.3.

Таблица 7.3

Комбинированное действие ионизирующего и СВЧ-излучения

Мощность СВЧ-излучения	Контроль		180 Вт		360 Вт		600 Вт	
	Без ИИ	С ИИ	Без ИИ	С ИИ	Без ИИ	С ИИ	Без ИИ	С ИИ
Число клеток в большом ква- драте камеры Горяева, шт.								
Среднее число клеток, шт.								
Погрешность								

3.10. Для всех экспериментов рассчитайте погрешность.

3.11. Постройте кривые выживаемости дрожжевых клеток в зависимости мощности СВЧ-излучения без воздействия ионизирующего излучения и с воздействием ионизирующего излучения. На оси абсцисс откладывается мощность СВЧ-излучения, на оси ординат — выживаемость (количество клеток, полученное в опыте, нормированное на количество клеток контроль-

ной группы, умноженное на 100 %). На полученных кривых постройте планки погрешностей.

3.12. Сравните полученные данные, сделайте вывод о влиянии предварительного воздействия СВЧ-излучения на чувствительность дрожжевых клеток к последующему действию ионизирующего излучения. С чем могут быть связаны полученные результаты?

Отчет

После выполнения лабораторной работы необходимо подготовить отчет, который должен содержать:

- основные используемые формулы;
- экспериментальные результаты в виде таблиц и графиков;
- необходимые справочные данные, расчет погрешности измерений;
- аргументированные выводы по работе с анализом экспериментальных данных.

Отчет должен быть оформлен в соответствии с общими установленными правилами, сдается один на бригаду, защищается каждым членом бригады.

Лабораторная работа № 8.

Исследование комбинированного действия ионизирующего излучения и ультразвука на микроорганизмы

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: экспериментально исследовать комбинированное действие ионизирующего излучения и ультразвука на микроорганизмы.

Данная лабораторная работа состоит из трех частей.

В первой части лабораторной работы экспериментально исследовано влияние ультразвука, создаваемого диспергатором ультразвуковым УЗДН-2Т, в зависимости от времени озвучивания на жизнедеятельность дрожжей.

Во второй части работы изучено влияние ультразвука, создаваемого медицинским аппаратом для ультразвуковых исследований, на дрожжи.

В третьей части работы проведено исследование комбинированного действия ионизирующего излучения и ультразвука на дрожжи.

Воздействие ультразвука

Одним из факторов, способным влиять на функциональное состояние микроорганизмов, является ультразвук (УЗ). Несмотря на то, что УЗ давно используют в различных отраслях науки, техники, медицины его влияние на живые организмы требует более детального изучения.

Ультразвуковые волны обладают большой механической энергией и вызывают ряд физических, химических и биологи-

ческих явлений. Поэтому не случаен интерес к изучению влияния и механизмам действия этого физического фактора на биологические объекты.

Ультразвуковыми называются упругие акустические волны, способные распространяться в материальных средах. Частицы среды не переносятся в направлении распространения волн, а лишь колеблются около положения равновесия. Волны бывают продольными, если направление колебаний частиц совпадает с направлением распространения волн, и поперечными, если эти направления взаимно перпендикулярны. В газообразных и жидких средах, в том числе в мягких тканях организмов и в клетках микроорганизмов, состоящих на 75 % из воды, распространяются продольные волны.

Биологическое действие ультразвуковых волн связывают в большей степени с явлением кавитации. Кавитацией называется процесс образования в жидкой среде полостей, заполненных парами самой жидкости, которые возникают под действием больших разрывающих напряжений и в следующее мгновение захлопываются, сопровождаясь большими давлениями и локальным нагревом среды. Явление кавитации носит локальный характер и не перемещается в среде. Импульсы давления, возникающие при смыкании кавитационных каверн, способны разрушать не только твердые и жидкие тела, но и многие биологические объекты, в частности микроорганизмы.

Химическое действие УЗ связано с тепловым механизмом химического действия кавитации, так как при адиабатическом сжатии кавитационного пузырька температура в нем может достигать 104 К. Большинство химических превращений под действием УЗ происходит в водных растворах. При высокой температуре молекулы воды внутри кавитационного пузырька переходят в возбужденное состояние и расщепляются на радикалы H^+ , OH^- , а также, возможно, ионизируются с образованием гидратированных электронов. Так, при воздействии УЗ на воду, в которой растворен воздух, образуются оксиды азо-

та и перекись водорода. Кроме того, пропускание ультразвука через вещества ускоряет ход некоторых химических реакций.

Как уже отмечалось, взаимодействие УЗ с биологическими средами приводит к его поглощению и преобразованию акустической энергии в тепловую. Характерно, что нагрев осуществляется не равномерно по всей толще тканей, а проявляется наиболее заметно на границах сред с различными волновыми сопротивлениями. Однако значительное повышение интенсивности УЗ и увеличение длительности его воздействия могут привести к чрезмерному нагреву биологических структур и их разрушению.

Также УЗ оказывает различное механическое воздействие на биологические объекты. При малых интенсивностях (до 2–3 Вт/см²) на частотах порядка 10⁵–10⁶ Гц колебания частиц биологической среды производят своеобразный микро-массаж тканевых элементов, способствующий лучшему обмену веществ.

Повышение интенсивности УЗ может привести к возникновению в биологических средах кавитации, а следовательно, и к механическому разрушению клеток и тканей; кавитационными «зародышами» при этом служат всегда имеющиеся в цитоплазме биологических клеток газовые пузырьки.

Влияние ультразвука на микроорганизмы

Наиболее удобным и наглядным материалом для исследования влияния УЗ на биологические свойства живых организмов являются микроорганизмы, поскольку именно на одноклеточных организмах в естественной среде обитания или в суспензии возможно получить наиболее очевидные результаты влияния УЗ на отдельные биологические клетки.

Одной из основных особенностей воздействия УЗ на микроорганизмы можно считать его влияние на клеточные мембраны. Действие УЗ может приводить к существенному измене-

нию механических, электрических и иных свойств клеточных мембран, а также к нарушению внутреннего состава клеток и изменению концентраций веществ, растворенных в цитоплазме.

При длительном воздействии УЗ последствия остаются в течение некоторого времени после прекращения облучения, и нормальная жизнедеятельность клетки может не восстановиться в течение минут, часов или даже дней.

Установлено, что особенно опасен для микроорганизмов низкочастотный УЗ, т. к. он способен механически разрывать клеточные мембраны, что приводит к нарушению целостности и гибели клеток. Однако даже при низких частотах механическое повреждение и гибель клеток происходят только при достаточно высоких интенсивностях УЗ, существенно превышающих физиологические дозы.

Изменение свойств мембраны под действием УЗ обусловлено по большей части «отрыванием» макромолекул и молекулярных комплексов мощным излучением с внешней поверхности мембраны. Оторванные соединения растворяются в окружающей среде и могут снова «вернуться» на свое прежнее место через некоторое время после прекращения ультразвукового воздействия. Оставшись без определенных составляющих, мембранные каналы меняют свою проводимость и иные свойства, в результате чего мембрана начинает аномально функционировать. У некоторых бактерий под действием УЗ наблюдается генерация мембраной электрического потенциала действия.

Следующая важная особенность действия УЗ на микроорганизмы — изменение концентрации различных веществ в составе цитоплазмы за счет изменения равновесной концентрации веществ вне и внутри клетки: акустическая волна создает микровихри в окружающей клетку среде, обеспечивая эффективное перемешивание раствора. Таким образом, воздействие УЗ приближает концентрацию веществ в цитоплазме, особенно ионов легких металлов, к их концентрации вне клетки. Это

делает клетку более зависимой от состава внешней среды и может нарушить внутренние процессы жизнедеятельности.

Эффекты, достигаемые в результате облучения ультразвуком биологических объектов, обычно обусловлены совместным действием многих факторов, и не всегда ясно, какой из них играет первостепенную роль.

Опубликовано большое число работ о действии акустических волн на бактерии и вирусы. При этом выяснилось, что результаты могут быть разнообразными: с одной стороны, исследователи наблюдали повышение агглютинации (склеивание и выпадение в осадок из однородной взвеси бактерий и других клеток), потерю патогенности или полную гибель бактерий, с другой стороны, отмечался обратный эффект — увеличение числа жизнеспособных особей. Последнее особенно часто имело место после кратковременного облучения.

Известно, что применение ультразвуковых волн малых интенсивностей (до 2 Вт/см^2) обычно вызывает положительные биологические эффекты. Разрушения жизнеспособных микроорганизмов не наступает, но при определенных условиях происходит стимуляция их роста и, как следствие, увеличение их числа.

Применение сравнительно больших интенсивностей ($3\text{--}10 \text{ Вт/см}^2$) и длительное облучение, как правило, вызывают необратимые повреждения клеток. Именно таким образом с помощью ультразвука разрушают микробактерии туберкулеза, возбудителей тифа, коклюша, вирусы полиомиелита, энцефалита и бешенства, некоторые виды кокков (стафилококки, стрептококки) и т. д.

Однако эффективность действия УЗ при одной и той же интенсивности и частоте колебаний также зависит от продолжительности воздействия, химического состава облучаемой среды, ее вязкости, температуры, pH и исходной степени обсемененности микроорганизмами. Чем больше микроорганизмов, тем продолжительнее должно быть воздействие для достижения стерилизующего эффекта.

Влияние ионизирующего излучения

Подробно об ионизирующем излучении и о его влиянии на биологические объекты изложено в предыдущих лабораторных работах.

Комбинированное действие ионизирующего излучения и ультразвука

Широкое внедрение в клинику комплексных методов лечения и часто встречающиеся сочетания УЗ с другими физическими факторами и фармакологическими средствами потребовали специального изучения реакции организма в целом и клетки в частности на такие комбинированные воздействия.

Особый интерес представляет исследование последовательного и одновременного действия на клетки ионизирующего и ультразвукового излучений. Подобная совокупность воздействий нередко встречается в диагностике и в терапии и требует пристального внимания.

Ранее в книге уже акцентировалось внимание, что при комбинированном действии различных факторов их вредное действие может суммироваться (независимое действие), ослабляться (антагонизм), либо усиливаться (синергизм). Синергическое взаимодействие факторов окружающей среды представляет особую опасность и привлекает внимание многих исследователей.

Благодаря толстой клеточной стенке дрожжи весьма резистентны к ультразвуковому воздействию и остаются жизнеспособными при достаточно интенсивном и длительном ультразвуковом облучении. Именно поэтому они являются удобной моделью для изучения действия УЗ.

Синергетический эффект действия УЗ и γ -излучения исследовался на дрожжевых клетках, находящихся в стационарной фазе роста. УЗ усиливал действие γ -излучения. Степень синергизма зависела от последовательности применения УЗ

и γ -излучения. Она была меньше для ($УЗ + \gamma$ -излучение), чем (γ -излучение + $УЗ$).

В результате комбинированного действия замечена пониженная способность клеток к восстановлению, в сравнении с действием монофакторов.

Предполагается, что ответственными за синергическое взаимодействие являются некоторые дополнительные эффективные повреждения, вызываемые комбинированными воздействиями. Дополнительные летальные повреждения возникают в результате взаимодействия субповреждений, индуцированных обоими агентами, причем эти субповреждения не являются эффективными, когда агенты применяются отдельно.

Оборудование и материалы

1. Микроскоп МБИ-15.
2. Счетная камера Горяева.
3. Краситель метиленовый синий.

Пункты 1–3 подробнее описаны в лабораторной работе № 1.

Для изучения влияния ультразвука на микроорганизмы используется диспергатор ультразвуковой УЗДН-2Т (рис. 8.1).



Рис. 8.1. Диспергатор ультразвуковой УЗДН-2Т

Диспергатор предназначен для препарирования объектов из волокнистых, кристаллических, порошкообразных и других веществ при электронно-микроскопических исследованиях в биологии, химии, медицине, минералогии, металловедении и других областях науки. Кроме основного назначения, диспергатор можно использовать для получения суспензий и эмульсий из различных веществ, отмывки мелких деталей от механических загрязнений, экспериментальных работ по изучению воздействия ультразвука на различные процессы. Рабочая частота генератора и излучателя 22 кГц. Мощность 1–10 Вт/см².

Также для исследования влияния УЗ на микроорганизмы используется аппарат УЗИ Mindray DP-50, предназначенный для диагностических исследований, с датчиком частотой 7,5 МГц и мощностью 0,1 Вт/см² (рис. 8.2).



Рис. 8.2. Аппарат УЗИ Mindray DP-50

Объекты исследования

В экспериментах будут использованы дрожжи вида *Saccharomyces cerevisiae* штамма JAY291. Оптимальный диапазон температур для размножения данного штамма составляет 20–25 °С.

Подробнее о дрожжах — в лабораторной работе № 1.

Порядок выполнения работы

1. Исследование влияния ультразвука на дрожжи

1.1. Приготовьте суспензию дрожжей (минимум за 5 часов до проведения лабораторной работы, чтобы дрожжи находились в стационарной фазе роста). Для приготовления препарата разведите 0,48 г сухих дрожжей в 240 мл теплой воды ($\sim 45\text{--}50^\circ\text{C}$), добавьте 9,99 г сахара, тщательно перемешайте и поставьте в теплое место.

1.2. Перед проведением экспериментов готовую дрожжевую суспензию тщательно перемешайте и разделите на 4 части по 60 мл.

1.3. Одна группа микроорганизмов является контрольной, ее необходимо поддерживать при постоянной температуре 22°C (комнатной температуре).

1.4. Вторую группу дрожжей подвергнете воздействию ультразвука в течение 5 мин аппаратом УЗДН-2Т.

1.5. На третью группу произведите воздействие ультразвука в течение 10 мин.

1.6. На четвертую группу — в течение 20 мин.

1.7. После каждого опыта проведите количественный учет микроорганизмов. Методика подсчета клеток подробно описана в лабораторной работе № 1.

1.8. Полученные данные занесите в табл. 8.1.

1.9. Для всех экспериментов рассчитайте погрешность.

1.10. Постройте кривую выживаемости дрожжевых клеток в зависимости от времени озвучивания. На оси абсцисс откладывается время воздействия ультразвуком, на оси ординат — выживаемость (количество клеток, полученное в опыте, нормированное на количество клеток контрольной группы, умноженное на 100 %). На полученной кривой постройте планки погрешностей.

1.11. По полученным данным сделайте вывод о влиянии ультразвука в зависимости от времени воздействия на жизнедеятельность дрожжей. С чем связаны полученные результаты?

Таблица 8.1

Влияние ультразвука на жизнедеятельность микроорганизмов

Время воздействия УЗ	Контроль			
Число клеток в большом квадра- те камеры Горье- ва, шт.				
Среднее число кле- ток, шт.				
Погрешность				

2. Изучение влияния медицинского ультразвука на жизнедеятельность дрожжей

2.1. Приготовьте суспензию дрожжей (минимум за 5 часов до проведения лабораторной работы, чтобы дрожжи находились в стационарной фазе роста). Для приготовления препарата разведите 0,48 г сухих дрожжей в 240 мл теплой воды (~45–50 °С), добавьте 9,99 г сахара, тщательно перемешайте и поставьте в теплое место.

2.2. Перед проведением экспериментов готовую дрожжевую суспензию тщательно перемешайте и разделите на 4 части по 60 мл.

2.3. Одна группа микроорганизмов является контрольной, ее необходимо поддерживать при постоянной температуре 22 °С (комнатной температуре).

2.4. Вторую группу дрожжей подвергнете воздействию ультразвука в течение 5 мин аппаратом УЗИ Mindray DP-50.

2.5. На третью группу произведите воздействие ультразвука в течение 10 мин.

2.6. На четвертую группу — в течение 20 мин.

2.7. После каждого опыта проведите количественный учет микроорганизмов. Методика подсчета клеток подробно опи-

сана в лабораторной работе № 1. Наблюдается ли какой-либо эффект?

2.8. Полученные данные занесите в табл. 8.2.

2.9. Сделайте вывод о влиянии медицинского ультразвука на выживаемость дрожжей. С чем связаны полученные результаты?

Таблица 8.2

**Влияние медицинского ультразвука
на жизнедеятельность микроорганизмов**

Время воздействия УЗ	Контроль			
Число клеток в большом квадрате камеры Горяева, шт.				
Среднее число клеток, шт.				

3. Комбинированное действие ионизирующего излучения и ультразвука

3.1. Приготовьте суспензию дрожжей (минимум за 5 часов до проведения лабораторной работы, чтобы дрожжи находились в стационарной фазе роста). Для приготовления препарата разведите 0,48 г сухих дрожжей в 240 мл теплой воды ($\sim 45\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$), добавьте 9,99 г сахара, тщательно перемешайте и поставьте в теплое место.

3.2. Перед проведением экспериментов готовую дрожжевую суспензию тщательно перемешайте и разделите на 4 емкости по 60 мл.

3.3. Одна группа микроорганизмов является контрольной, ее необходимо поддерживать при постоянной температуре $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (комнатной температуре).

3.4. Вторую группу дрожжей подвергните воздействию ультразвука в течение 5 мин аппаратом УЗДН-2Т.

3.5. На третью группу произведите воздействие ультразвука в течение 10 мин.

3.6. На четвертую группу — в течение 20 мин.

3.7. После проведенных экспериментов каждую группу микроорганизмов разделите на две подгруппы, одну из подгрупп каждой группы поместите в источник ионизирующего излучения ^{241}Am на два часа.

3.8. Проведите количественный учет микроорганизмов для всех подгрупп. Методика подсчета клеток подробно описана в лабораторной работе № 1.

3.9. Полученные данные занесите в табл. 8.3.

Таблица 8.3

Комбинированное действие ионизирующего излучения и ультразвука

Время воздействия УЗ	Контроль							
	Без ИИ	С ИИ	Без ИИ	С ИИ	Без ИИ	С ИИ	Без ИИ	С ИИ
Число клеток в большом квадрате камеры Горяева, шт.								
а, шт.								
Погрешность								

3.10. Для всех экспериментов рассчитайте погрешность.

3.11. Постройте кривые выживаемости дрожжевых клеток в зависимости от длительности озвучивания без воздействия ионизирующего излучения и с воздействием ионизирующего излучения. На оси абсцисс откладывается время воздействия УЗ, на оси ординат — выживаемость (количество клеток, полученное в опыте, нормированное на количество клеток контрольной группы, умноженное на 100 %). На полученных кривых постройте планки погрешностей.

3.12. Сравните полученные данные, сделайте вывод о влиянии предварительного озвучивания на чувствительность дрожжевых клеток к последующему действию ионизирующего излучения. С чем могут быть связаны полученные результаты?

Отчет

После выполнения лабораторной работы необходимо подготовить отчет, который должен содержать:

- основные используемые формулы;
- экспериментальные результаты в виде таблиц и графиков;
- необходимые справочные данные, расчет погрешности измерений;
- аргументированные выводы по работе с анализом экспериментальных данных.

Отчет должен быть оформлен в соответствии с общими установленными правилами, сдается один на бригаду, защищается каждым членом бригады.

Библиографический список

1. Тесты и задачи по клинической лабораторной диагностике. Работа с камерой Горяева [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://cldtest.ru/hdbk/chamber>. — Загл. с экрана.
2. Бабьева, И. П. Биология дрожжей : учебное пособие / И. П. Бабьева, И. Ю. Чернов. — Москва, 2004. — 239 с.
3. Бурьян, Н. И. Микробиология виноделия / Н. И. Бурьян, Л. В. Тюрина. — Москва : Пищевая промышленность, 1979. — 271 с.
4. Бондаренко, А. П. Основы радиационной экологии : учебно-метод. пособие / А. П. Бондаренко. — Павлодар : Павлодарский гос. ун-т им. С. Торайгырова, 2007. — 100 с. — Ч. 2.
5. Кудряшов, Ю. Б. Радиационная биофизика (ионизирующее излучение) : учебник / Ю. Б. Кудряшов. — Москва : Физматлит, 2004. — 448 с.
6. Еремина, И. А. Микробиология : учебное пособие / И. А. Еремина. — Кемерово : КемТИПП, 1997. — 114 с.
7. Петин, В. Г. Комбинированное биологическое действие ионизирующих излучений и других вредных факторов окружающей среды / В. Г. Петин, И. П. Дергачева, Г. П. Жураковская // Радиация и риск. — 2001. — № 12. — С. 117–134.
8. Комарова, Л. Н. Комбинированное действие ионизирующего излучения и других факторов окружающей среды

- на живые организмы: новые закономерности и перспективы : автореф. дис. ... д-ра. биол. наук : 03.00.01 / Комарова Людмила Николаевна ; Медицинский радиологический научный центр РАМН. — Обнинск, 2009. — 32 с.
9. РГАУ-МСХА, зооинженерный факультет : Облучение дрожжей при низких температурах [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.activestudy.info/obluchenie-drozhzhej-pri-nizkix-temperaturax/>. — Загл. с экрана.
 10. Грецова, Н. В. Механизмы воздействия низкоинтенсивного ЭМИ на клетку : автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук: 01.04.04, 03.00.02 / Грецова Наталья Владимировна ; Волгоградский техн. ун-т. — Волгоград, 2005. — 121 с.
 11. Акопян, В. Б. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами : Ультразвук в медицине, ветеринарии и экспериментальной биологии / В. Б. Акопян. — Москва : МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2005. — 224 с.
 12. Шиляев, А. С. Физические основы применения ультразвука в медицине и экологии : учебно-метод. пособие / А. С. Шиляев. — Минск : МГЭУ им. А. Д. Сахарова, 2009. — 110 с.
 13. Гайдамака, И. И. Физическая характеристика и механизм действия ультразвука / И. И. Гайдамака // Сайт медиков-радиологов [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://smham.ucoz.ru/publ/2-1-0-55>. — Загл. с экрана.
 14. Шиляев, А. С. Ультразвук в науке, технике и технологии / А. С. Шиляев. — Гомель : Институт радиологии, 2007. — 412 с.
 15. Petin, V. G. Combined action of ultrasound and ionizing radiation on yeast cells / V. G. Petin, V. P. Komarov, V. G. Skvortzov // Radiation and Environmental Biophysics. — 1980. — № 12. — С. 45–55.

